

Mechanismen der Lebensverlängerung

durch D-Glucosamin und Ritalin

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der

Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Ernährungswissenschaftlerin

Josephine Prieb

geboren am 22.04.1985 in Dessau

Gutachter

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Ristow
ETH Zürich
Professur f. Energiestoffwechsel
SLA C 6
Schorenstrasse 16
8603 Schwerzenbach
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Matthias Blüher
Universitätsklinikums Leipzig
Klinik für Endokrinologie und Nephrologie des
Departments für Innere Medizin und Dermatologie
Liebigstr. 20
04103 Leipzig
3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Michael Glei
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Institut für Ernährungswissenschaften
Dornburger Straße 25
07743 Jena

Termin der öffentlichen Disputation: 07. Oktober 2013

Inhalt

Inhalt.....	I
Zusammenfassung	IV
Summary	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	XI
1 Einleitung	1
1.1 Der Nematode <i>Caenorhabditis elegans</i> als experimenteller Modellorganismus.....	1
1.2 Bedeutung des oxidativen Stresses im Alterungsprozess	3
1.2.1 <i>Free Radical Theory of Ageing (FRTA)</i>	3
1.2.2 <i>Mitochondrial Theory of Ageing</i>	4
1.2.3 Mitohormesis	5
1.3 Einfluss der Kalorienrestriktion auf die Lebenserwartung	8
1.4 Untersuchte pharmakologische Substanzen	9
1.4.1 D-Glucosamin	9
1.4.2 Ritalin	11
1.5 Zielsetzung.....	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Medien, Puffer und Lösungen.....	14
2.1.2 Verwendete Organismen.....	17
2.1.3 Software	18
2.2 Methode.....	19
2.2.1 Bakterienkultur <i>E. coli</i>	19
2.2.2 <i>C. elegans</i>	19
2.2.2.1 Erhaltung	19
2.2.2.2 Synchronisierung.....	20
2.2.2.3 Inkubation.....	20

2.2.2.4	Ernten der <i>C. elegans</i> - Kultur	21
2.2.2.5	Analyse der Lebensspanne	21
2.2.2.6	Analyse der Stressresistenz	21
2.2.2.7	Paralyse	22
2.2.2.8	Bestimmung der Glukoseaufnahme	22
2.2.2.9	Bestimmung der Glukoseoxidation	23
2.2.2.10	ATP-Bestimmung	24
2.2.2.11	Bestimmung der Respirationsrate.....	25
2.2.2.12	Bestimmung der mitochondrialen ROS-Produktion	26
2.2.2.13	Quantifizierung von Wasserstoffperoxid.....	26
2.2.2.14	Bestimmung der Zitratsynthaseaktivität	27
2.2.2.15	Bestimmung der Katalase- und Superoxiddismutaseaktivität.....	28
2.2.2.16	Messung der Komplex-1-Aktivität in der Atmungskette	29
2.2.2.17	Bestimmung des Fettgehaltes	30
2.2.2.18	Quantifizierung der Pumprate	30
2.2.2.19	Quantifizierung der Nahrungsaufnahme	31
2.2.2.20	Messung der Beweglichkeit	32
2.2.2.21	Western Blot.....	32
2.2.2.22	Laserablation von ASI-Neuronen	33
2.2.2.23	DNA-Isolation	34
2.2.2.24	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	35
2.2.2.25	Proteinbestimmung.....	36
2.2.2.26	Statistik.....	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Glucosamin	38
3.1.1	Auswirkung von GlcN auf die Lebenserwartung	38
3.1.2	Einfluss von GlcN auf die Nahrungsaufnahme	39
3.1.3	Wirkung von GlcN auf den Glukosestoffwechsel	40
3.1.4	Effekte von GlcN auf die Energiebilanz	41
3.1.5	Wirkung von GlcN auf den Mitochondrienstoffwechsel	43
3.1.6	Effekte von GlcN auf die Aktivität antioxidativer Enzyme	46
3.1.7	Auswirkung von GlcN auf die Stressresistenz	47
3.1.8	Effekt von GlcN auf die Lebensspanne in Gegenwart von Antioxidantien	49

3.1.9	Wirkung von GlcN auf ROS-Sensoren.....	51
3.2	Ritalin.....	54
3.2.1	Auswirkung von Ritalin auf die Lebenserwartung	54
3.2.2	Einfluss von Ritalin auf die Beweglichkeit	54
3.2.3	Wirkung von Ritalin auf die Komplex-1-Aktivität der Atmungskette	55
3.2.4	Einfluss von Ritalin auf die Nahrungsaufnahme.....	56
3.2.5	Effekte von Ritalin auf die Energiebilanz	57
3.2.6	Einfluss von Ritalin auf den Fettgehalt.....	59
3.2.7	Wirkung von Ritalin auf den Mitochondrienstoffwechsel	59
3.2.8	Effekte von Ritalin auf die Aktivität antioxidativer Enzyme	62
3.2.9	Auswirkung von Ritalin auf die oxidative Stressresistenz.....	63
3.2.10	Effekt von Ritalin auf die Lebenszeit in Gegenwart von einem Antioxidans	63
3.2.11	Wirkung von Ritalin auf ROS-Sensoren.....	65
3.2.12	Einfluss von Dopamin bei der Ritalin-vermittelten Lebensverlängerung.....	69
3.2.12.1	Effekt von Ritalin auf die Lebenserwartung von Dopamin-Mutanten	69
3.2.12.2	Effekt von Dopamin auf die Lebenserwartung.....	71
3.2.12.3	Auswirkung von Dopamin auf die oxidative Stressresistenz.....	72
3.2.12.4	Wirkung von Dopamin auf die Nahrungsaufnahme	73
3.2.12.5	Auswirkung von Dopamin auf den Energiegehalt.....	74
4	Diskussion.....	75
	Literaturverzeichnis.....	X
	Anhang	XXXII
	Manuskripte und Wissenschaftliche Vorträge.....	XLII
	Ehrenwörtliche Erklärung	
	Danksagung	

Zusammenfassung

Die Kalorienrestriktion gehört zu den überzeugendsten Interventionen zur Verzögerung des Auftretens von chronischen Erkrankungen, zur Verlangsamung des allgemeinen Alterungsprozesses und zur Steigerung der Lebenserwartung.

Durch eine Behandlung mit den beiden untersuchten pharmakologischen Substanzen D-Glucosamin (GlcN) und Ritalin konnte der metabolische Zustand einer Kalorienrestriktion simuliert und eine Lebensverlängerung im *C. elegans* Modell beobachtet werden. So führte eine Inkubation mit GlcN zu einer Verminderung der intrazellulären Glukoseverstoffwechselung und eine Behandlung mit Ritalin zu einer stark reduzierten Nahrungsaufnahme. Dabei scheint die verringerte Nahrungszufuhr durch Ritalin aus dessen Hemmung des Dopamintransporters und dem damit verstärkten Dopaminsignal zu resultieren.

Folglich konnte nach der Inkubation mit GlcN und Ritalin zunächst ein Abfall des ATP-Gehaltes festgestellt werden, wodurch die AMP-abhängige Proteinkinase (AMPK) zum Ausgleich des Energiedefizits verstärkt aktiviert wurde. Bei beiden Substanzen verstärkte die Phosphorylierung der AMPK/AAK-2 die mitochondriale Biogenese und Aktivität, sodass durch die vermehrte oxidative Phosphorylierung in der Atmungskette der ATP-Gehalt wieder ausgeglichen werden konnte. Aus der damit einhergehend verstärkten Respiration resultierte eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche nachfolgend die Stresskinase p38 MAPK/PMK-1 aktivierte. Abhängig von den Transkriptionsfaktoren NRF2/SKN-1 und FOXO/DAF-16 wurde eine verstärkte Aktivität der antioxidativ wirkenden Enzyme beobachtet. Dementsprechend wurde ein Anstieg der Superoxiddismutase und Katalase durch eine Behandlung mit GlcN und Ritalin festgestellt, wodurch ein ROS-Abfall nach langfristiger Inkubation der Substanzen erklärt werden könnte. Der initiale ROS-Anstieg war dabei für die GlcN- und Ritalin-vermittelte Lebensverlängerung notwendig, denn durch eine Supplementierung mit Antioxidantien wurde dieser Effekt vollständig aufgehoben.

Die adaptive Antwort infolge des induzierten oxidativen Stresses bewirkte eine langfristig gesteigerte oxidative Stressresistenz und verlängerte die Lebenserwartung von *C. elegans*. Diese Erkenntnisse stützen die Theorie der Mitohormesis, die besagt, dass erhöhte Abwehrmechanismen infolge der kurzzeitig induzierten ROS-Produktion in den Mitochondrien für eine gesundheitsfördernde bzw. lebensverlängernde Wirkung verantwortlich sind.

Summary

Caloric restriction is one of the most important interventions to delay the onset of chronic diseases, to decelerate ageing, and to extend life span.

Two pharmacological compounds, D-glucosamine (GlcN) and ritalin, were evaluated and shown to mimic a caloric restriction-like metabolic state culminating in increased life span of the nematode *C. elegans*. Incubation with GlcN led to an impairment of intracellular glucose metabolism, while treatment with ritalin strongly reduced food uptake. The decrease in food ingestion by ritalin was linked to its inhibition of dopamine reuptake and a consequently amplified dopamine signal.

Following exposure to both compounds, a reduction of ATP content was detected which activated the AMP-dependent protein kinase (AMPK) to compensate the energy deficit. AMPK/AAK-2 activation promoted mitochondrial biogenesis and activity leading to a compensatory increase in ATP levels due to enhanced oxydative phosphorylation. Increased respiration rates promoted production of reactive oxygen species which subsequently activated the MAP kinase p38/PMK-1. Depending on NRF2/SKN-1 and FOXO/DAF-16 activities antioxidative enzymes were upregulated. These increased activities of superoxide dismutase and catalase explain the decrease in ROS after a long-term incubation with either compound. The initial short-term increase in ROS was found to be required for GlcN- or ritalin-mediated life span extension since supplementation with antioxidants completely abolished the effects on life span.

This adaptive response due to the induced oxidative stress caused a long-term enhanced oxidative stress resistance and extension of life span in *C. elegans*. These findings support the concept of mitohormesis, in which increased defense mechanisms as a result of short-term induced ROS-production in the mitochondria are required for the health-promoting and life span extending effects.

Abkürzungsverzeichnis

AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-abhängige Proteinkinase
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BHA	Butylhydroxyanisol
Bicin	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-glycin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Ci	Curie
Cpm	<i>counts per minute</i>
DIC	<i>differential interference contrast</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
DTPA	Diethylentriaminpentaacetat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FRTA	<i>Free Radical Theory of Ageing</i>
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GlcN	Glucosamin
GLUT	Glukosetransporter
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KIO ₄	Kaliumperiodat
KOH	Kaliumhydroxid
KR	Kalorienrestriktion
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MPH	Methylphenidat
MQ	Milli-Q™-Wasser

mtDNA	mitochondriale DNA
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₃ VO ₄	Trinatriumtetraoxovanadat
NGM	Nematode Growth Medium
NPY	Neuropeptid Y
ns	Newton-Sekunde
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGC-1 α	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POMC	Proopiomelanocortin
PP	Pyrophosphat
Purpald	4-Amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole
RC	relative Kopienanzahl
RFU	<i>relative fluorescence units</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
STABW	Standardabweichung
TBST	Tris Bufferd Saline + Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNB	Thionitrobenzoesäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]-1,3-Benzene Disulfonat
XO	Xanthinoxidase

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lebenszyklus von <i>C. elegans</i> bei 22°C.	2
Abbildung 2: Anatomie eines adulten <i>C. elegans</i> Hermaphroditen.....	3
Abbildung 3: Hormesis vs. Lineare Dosis-Wirkungs-Kurve.	6
Abbildung 4: Mitohormetische Dosis-Wirkungsbeziehung für reaktive Sauerstoffspezies. ..	7
Abbildung 5: Stoffwechsel von Glucosamin.	10
Abbildung 6: Wirkung von Ritalin (MPH) auf das dopaminerge System.	12
Abbildung 7: Prinzip der ATP-Bestimmung.	24
Abbildung 8: Prinzip der H ₂ O ₂ -Quantifizierung.	27
Abbildung 9: Reaktionen bei der Bestimmung der Zitratsynthaseaktivität.	28
Abbildung 10: Prinzip der Messung der SOD-Aktivität.	29
Abbildung 11: Effekt von GlcN auf die Lebenserwartung.	38
Abbildung 12: Effekt von GlcN (10 µM; 100 µM; 1000 µM) auf die Lebenserwartung.....	39
Abbildung 13: Effekt von GlcN auf die Nahrungsaufnahme.....	40
Abbildung 14: Effekt von GlcN auf die Glukoseaufnahme.	40
Abbildung 15: Effekt von GlcN auf die Glukoseoxidation.....	41
Abbildung 16: Effekt von GlcN auf den ATP-Gehalt.	41
Abbildung 17: Effekt von GlcN auf die Aktivierung der AMPK/AAK-2.....	42
Abbildung 18: Effekt von GlcN auf die Lebenserwartung von <i>aak-2</i> Mutanten.	42
Abbildung 19: Effekt von GlcN auf die Lebenserwartung von <i>sir2.1</i> Mutanten.	43
Abbildung 20: Effekt von GlcN auf die Zitratsynthaseaktivität.	44
Abbildung 21: Effekt von GlcN auf die Expression mitochondrialer Gene.	44
Abbildung 22: Effekt von GlcN auf die Respiration.....	45
Abbildung 23: Effekt von GlcN auf die mitochondriale ROS-Produktion.	45
Abbildung 24: Effekt von GlcN auf die Wasserstoffperoxidproduktion.	46
Abbildung 25: Effekt von GlcN auf die SOD-Aktivität.	47
Abbildung 26: Effekt von GlcN auf die Katalase Aktivität.....	47
Abbildung 27: Effekt von GlcN auf die Paraquat-Stressresistenz.	48
Abbildung 28: Effekt von GlcN auf die Paralyse.....	48
Abbildung 29: Effekt von NAC auf die Lebenserwartung.....	49
Abbildung 30: Effekt von BHA auf die Lebenserwartung.....	49
Abbildung 31: Effekt von GlcN auf die Lebenserwartung in Anwesenheit von NAC.	50
Abbildung 32: Effekt von GlcN auf die Lebenserwartung in Anwesenheit von BHA.....	50

Abbildung 33: Effekt von GlcN auf die Aktivierung der p38 MAPK/PMK-1.	51
Abbildung 34: Effekt von GlcN auf die Lebenserwartung von <i>pmk-1</i> Mutanten.	52
Abbildung 35: Effekt von GlcN auf die Lebenserwartung von <i>skn-1</i> Mutanten.	52
Abbildung 36: Effekt von GlcN auf die Lebenserwartung von <i>daf-16</i> Mutanten.	53
Abbildung 37: Effekt von Ritalin auf die Lebenserwartung.	54
Abbildung 38: Effekt von Ritalin auf die Beweglichkeit.	55
Abbildung 39: Effekt von Ritalin auf die Komplex-1-Aktivität.	55
Abbildung 40: Effekt von Ritalin auf die Pharynxkontraktion.	56
Abbildung 41: Effekt von Ritalin auf die Nahrungsaufnahme.	57
Abbildung 42: Effekt von Ritalin auf den ATP-Gehalt.	57
Abbildung 43: Effekt von Ritalin auf die Aktivierung der AMPK/AAK-2.	58
Abbildung 44: Effekt von Ritalin auf die Lebenserwartung von <i>aak-2</i> Mutanten.	58
Abbildung 45: Effekt von Ritalin auf den Fettgehalt.	59
Abbildung 46: Effekt von Ritalin auf die Zitratsynthaseaktivität.	60
Abbildung 47: Effekt von Ritalin auf die Respiration.	60
Abbildung 48: Effekt von Ritalin auf die mitochondriale ROS-Produktion.	61
Abbildung 49: Effekt von Ritalin auf die Wasserstoffperoxidproduktion.	61
Abbildung 50: Effekt von Ritalin auf die SOD-Aktivität.	62
Abbildung 51: Effekt von Ritalin auf die Katalase-Aktivität.	62
Abbildung 52: Effekt von Ritalin auf die Paraquat-Stressresistenz.	63
Abbildung 53: Effekt von NAC auf die Lebenserwartung.	64
Abbildung 54: Effekt von Ritalin auf die Lebenserwartung in Anwesenheit von BHA.	64
Abbildung 55: Effekt von Ritalin auf die Aktivierung der p38 MAPK/PMK-1.	65
Abbildung 56: Effekt von Ritalin auf die Lebenserwartung von <i>pmk-1</i> Mutanten.	66
Abbildung 57: Effekt von Ritalin auf die Lebenserwartung von <i>skn-1</i> (zu135) Mutanten. ...	66
Abbildung 58: Effekt von Ritalin auf die Lebenserwartung von <i>skn-1</i> (zu67) Mutanten.	67
Abbildung 59: Effekt von Ritalin auf die Lebenszeit von <i>kyls128</i> Mutanten (ASI-Ablation).68	
Abbildung 60: Effekt von Ritalin auf die Lebenszeit von <i>kyls128</i> Mutanten (ohne Ablation)68	
Abbildung 61: Effekt von Ritalin auf die Lebenserwartung von <i>daf-16</i> Mutanten.	69
Abbildung 62: Effekt von Ritalin auf die Lebenserwartung von <i>cat-2</i> Mutanten.	70
Abbildung 63: Effekt von Ritalin auf die Lebenserwartung von <i>dat-1</i> Mutanten.	70
Abbildung 64: Effekt von Ritalin auf die Lebenszeit von Dopaminrezeptor-Mutanten.	71
Abbildung 65: Effekt von Dopamin auf die Lebenserwartung.	72
Abbildung 66: Effekt von Dopamin auf die Paraquat-Stressresistenz.	72

Abbildung 67: Effekt von Dopamin und Ritalin auf die Nahrungsaufnahme.....	73
Abbildung 68: Effekt von <i>dat-1</i> Mutanten auf die Nahrungsaufnahme.....	74
Abbildung 69: Effekt von Dopamin auf den ATP Gehalt.	74
Abbildung 70: Möglicher Wirkmechanismus von GlcN und Ritalin.	89

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Puffer und Lösungen für den Western Blot.....	16
Tabelle 2: Herstellung der Polyacrylamidgele für den Western Blot.....	17
Tabelle 3: Primär und Sekundärantikörper für Western Blot	17
Tabelle 4: Mammalische Orthologe zu Mutationen in <i>C. elegans</i>	18
Tabelle 5: Reaktionsansatz und Reaktionsverlauf der Real-Time PCR.....	35
Tabelle 6: Chemikalien und Reagenzien.....	XXXII
Tabelle 7: Laborgeräte und Arbeitsmittel	XXXV
Tabelle 8: Statistische Analysen der Lebenskurven unter GlcN-Behandlung.....	XXXVIII
Tabelle 9: Statistische Analysen der Lebenskurven unter Ritalin-Behandlung.....	XL

1 Einleitung

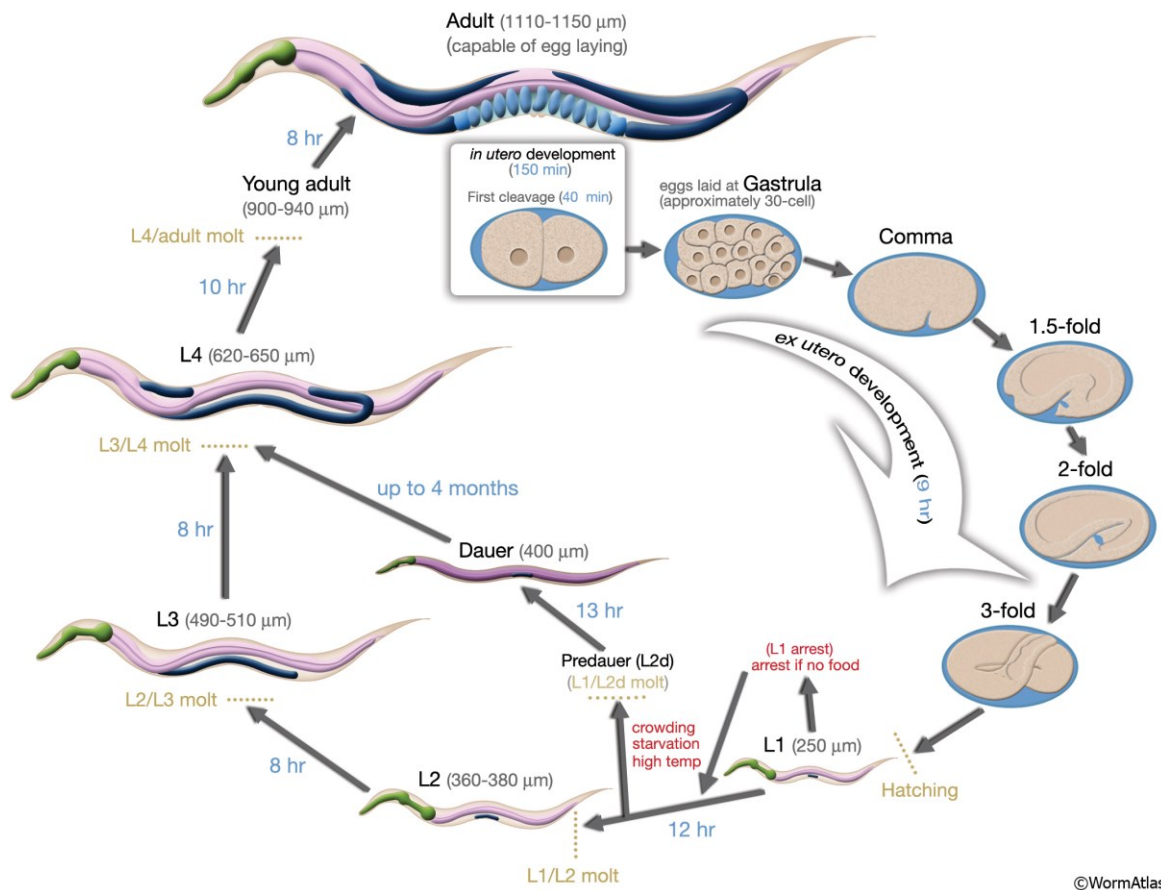
1.1 Der Nematode *Caenorhabditis elegans* als experimenteller Modellorganismus

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) ist ein ca. ein Millimeter langer, transparenter und freilebender Fadenwurm, der in den Böden gemäßigter Klimazonen vorkommt [Brenner 1974, Kenyon 1988]. Er ernährt sich von bodenlebenden Bakterien (hauptsächlich *E. coli*) und weist eine hohe Fortpflanzungsrate auf [Brenner 1974]. Nur ca. 0,2 % der Population sind Männchen, der größte Anteil der Individuen sind Hermaphroditen, welche sich durch Selbstbefruchtung vermehren können [Hodgkin *et al.* 1979]. Ein ausgewachsener Hermaphrodit bringt ungefähr 300 Nachkommen hervor, die aus Eiern über vier Larvenstadien (L1 bis L4) zu adulten Würmern heranwachsen [Riddle *et al.* 1997] (Abbildung 1). Unter ungünstigen Lebensbedingungen (z. B. Nahrungsmangel, Hitze, hohe Populationsdichte) können sich aus den L2-Larven Dauerlarven entwickeln, welche mehrere Monate in diesem Stadium verbleiben und sich später bei Verbesserung der Bedingungen zu adulten Tieren weiterentwickeln können [Vanfleteren und Braeckman 1999]. Die maximale Lebensspanne von *C. elegans* beträgt etwa 30 Tage, wobei die mittlere Lebenserwartung bei ca. 18-20 Tagen liegt.

C. elegans wird in der Wissenschaft als weit verbreiteter experimenteller Modellorganismus verwendet, da er wichtige Merkmale höherer Organismen aufweist, wie z. B. ein Nervensystem, ein Gastrointestinaltrakt, ein Reproduktionssystem und eine Epidermis [Jorgensen und Mango 2002] (Abbildung 2). Weiterhin besitzt dieser Fadenwurm kein Kreislaufsystem, sodass der Transport von Sauerstoff, Kohlendioxid und Nährstoffen durch passive Diffusion innerhalb der Flüssigkeit im Pseudozölon (fluidgefüllte Leibeshöhle) erfolgt [Altun und Hall 2012]. Seine Zellkonstanz von 959 somatischen Zellen (Hermaphrodit) und seine geringe Genomgröße ermöglichen eine detaillierte Analyse der Morphologie und des Genoms [Brenner 1974], welches bereits 1998 komplett sequenziert werden konnte [Consortium 1998]. Die Stoffwechselwege in Würmern und Menschen sind in hohem Maße konserviert. So wird in der Zellatmung von *C. elegans* die Glykolyse, die Pyruvatdecarboxylierung, die β -Oxidation, der Zitronensäurezyklus und die Elektronentransportkette mit der ATP-Synthese durchlaufen [Holt und Riddle 2003]. Bei anaeroben Bedingungen können die Nematoden, wie auch der Mensch, Energie durch anaerobe Glykolyse gewinnen, in der Milchsäure gebildet wird. Aber im Gegensatz zum Menschen ist

es *C. elegans* sogar möglich die ethanolische Fermentation [Holt und Riddle 2003] und die Malat-Dismutation zu nutzen. Des Weiteren können verschiedene Verhaltensweisen, wie z. B. Lokomotion (Kriechen oder Schwimmen), Fressen (pharyngales Pumpen) und Eiablage, im Fadenwurm problemlos untersucht werden [de Bono und Maricq 2005]. Mittels Laserablation von Neuronen können die neuronalen Schaltkreise, die mit diesen Verhaltensweisen assoziiert sind, analysiert werden [de Bono und Maricq 2005].

Durch die kurze Lebensspanne und Generationszeit, die ethische Unbedenklichkeit, das Vorhandensein verschiedener Mutantenstämme und die Nutzung von RNA-Interferenz wird der leicht zu kultivierende Fadenwurm gerne in der Wissenschaft zur Erforschung der Alterung und Langlebigkeit herangezogen. Auch zur Untersuchung komplexer menschlicher Erkrankungen wie Alzheimer [Link 2006], Krebs [Poulin *et al.* 2004], und Diabetes [Morcos und Hutter 2009] wird der Nematode genutzt, da ca. 60-80 % seiner Gene homolog zu menschlichen Genen sind [Kaletta und Hengartner 2006].



©WormAtlas

Abbildung 1: Lebenszyklus von *C. elegans* bei 22°C.

Die blaue Beschriftung an den Pfeilen gibt die Zeitspanne der verschiedenen Entwicklungsstadien an. Über vier Stadien reifen die Larven zu adulten Nematoden heran. [Altun und Hall 2012]

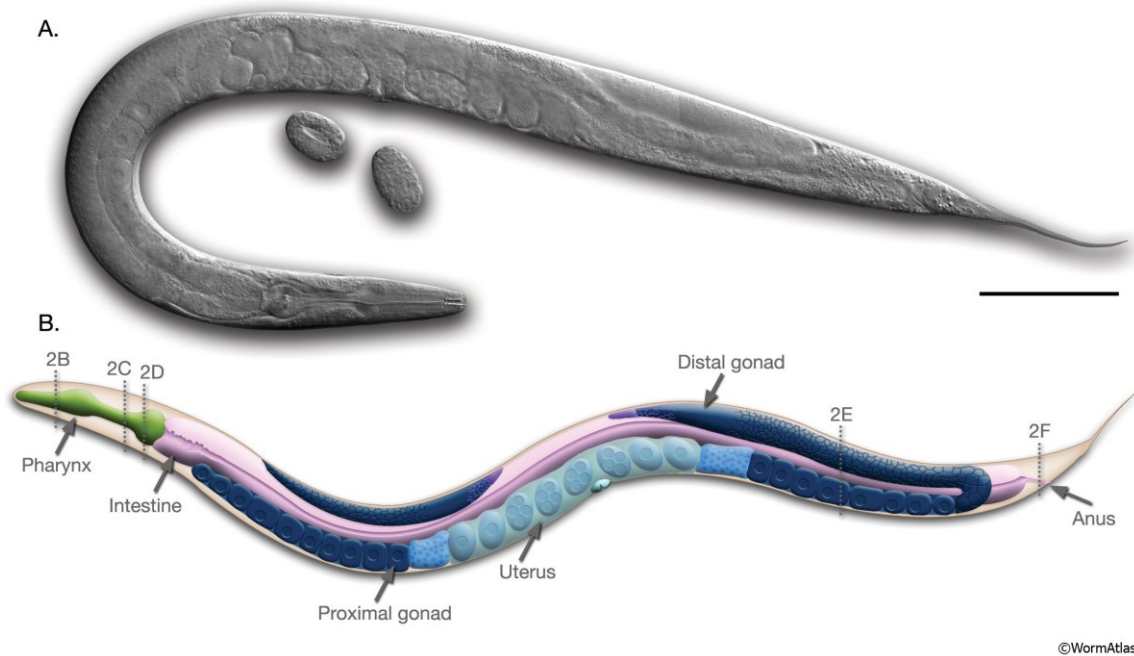


Abbildung 2: Anatomie eines adulten *C. elegans* Hermaphroditen.

A DIC Aufnahme; Maßstabsleiste: 0,1 mm; von oben betrachtete Darstellung.

B Schematische Abbildung der anatomischen Strukturen; linke seitliche Darstellung.

[Altun und Hall 2012]

1.2 Bedeutung des oxidativen Stresses im Alterungsprozess

Das Verstehen des Alterns war in der Vergangenheit und bleibt auch in der Gegenwart ein stark erforschtes Gebiet. Dieses komplexe, multifaktorielle Phänomen ist allgemein durch nicht-reversible Funktionsverluste von Zellen gekennzeichnet und führt zwangsläufig zum Tod. Bis heute gibt es keine wissenschaftlich akzeptierte umfassende Definition des Alterungsprozesses, aber über 300 verschiedenen Alterungstheorien [Medvedev 1990].

1.2.1 Free Radical Theory of Ageing (FRTA)

Eine der bedeutendsten Theorien zur Erklärung des Alterns ist die „Free Radical Theory of Ageing“, welche von Harman 1956 aufgestellt wurde [Harman 1956]. Demnach sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS) für die altersassoziierten Schäden im Organismus verantwortlich. Laut Harman führt dabei eine erhöhte Stoffwechselrate zu vermehrten ROS Formationen, welche anschließend Zellschäden verursachen, die im Laufe des Lebens

einer Zelle akkumulieren. Wenn das antioxidative Schutzsystem nicht mehr gegen den oxidativen Stress entgegenwirken kann, kommt es zu Dysfunktionen und Apoptose, wodurch die Alterung begünstigt wird [Harman 1956, 1972].

Neben der mitochondrialen Atmungskette als Hauptquelle der reaktiven Sauerstoffspezies, entstehen ROS auch als Folgeprodukte metabolischer Reaktionen im Zellplasma, im endoplasmatischen Retikulum, in der Plasmamembran und im Peroxisomen [Patel und Day 1999]. Dabei können reaktive Sauerstoffspezies lebensnotwendige Moleküle der Zellen, wie z. B. DNA, Proteine und Lipide irreversibel schädigen. Die Anreicherung der Sauerstoffradikale durch die Auslenkung des natürlichen Redoxgleichgewichts zugunsten oxidativer Bedingungen fördert demnach molekulare Schäden, die für Krankheiten, Alterung und Tod verantwortlich sind. So wurde in alten Tieren ein erhöhter Gehalt an oxidierten Proteinen, DNA-Molekülen und Lipiden bestimmt [Sohal *et al.* 1993, Stadtman 1992] und die reaktiven Sauerstoffspezies mit der Entstehung von degenerativen Erkrankungen assoziiert [Alam *et al.* 1997a, Alam *et al.* 1997b, Coyle und Puttfarcken 1993]. Weiterhin konnte durch Gabe von Antioxidantien [Vina *et al.* 1992] bzw. Überexpression von antioxidativen Enzymen [Orr und Sohal 1994] eine Verlängerung der Lebenserwartung in *Drosophila* festgestellt werden. Neuere Veröffentlichungen zeigen aber, dass Antioxidantien nicht immer die erwarteten positiven Ergebnisse erreichen und z. T. auch ungünstige Effekte erzielen [Howes 2006, Le Bourg und Fournier 2004, Riccioni *et al.* 2007].

1.2.2 Mitochondrial Theory of Ageing

Oxidativer Stress entsteht größtenteils in den Mitochondrien beim Durchlaufen der Atmungskette. Durch die unvollständige Reduktion entstehen aus ein bis zwei Prozent des Sauerstoffs kein Wasser, sondern das hochreaktive Superoxidanionradikal [Boveris und Chance 1973, Cohen 1994]. Bei dieser Störung des Elektronentransfers in der mitochondrialen Atmungskette sind besonders der Komplex-1 (NADH-Dehydrogenase) und der Komplex-3 (Cytochrom-c-Reduktase) involviert [Chance *et al.* 1979, Turrens 1997]. Durch die Reaktion mit Protonen kann das Superoxidradikal in das Wasserstoffperoxid übergehen, welches durch Elektronenaufnahme von Metallionen (Fenton-Reaktion) zum Hydroxylradikal reagieren kann [Cohen 1994]. Das Superoxidanion, welches auch durch Anionenkanäle die Mitochondrien verlassen kann [Han *et al.* 2003], wird durch die Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid umgewandelt [Fridovich 1978]. Dieses kann durch die Mitochondrienmembran leicht diffundieren und wird durch die Katalase zu Wasser und Sauerstoff konvertiert [Fridovich 1978]. Eine unzureichende Entgiftung dieser reaktiven

Sauerstoffspezies führt zu deren Akkumulation und damit zu strukturellen und funktionalen Störungen in Zellen.

Dementsprechend bewirkt auch eine verstärkte Beschädigung der Mitochondrien-DNA durch oxidativen Stress eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion. In Anlehnung daran stellten Miquel und Kollegen die „*Mitochondrial Theory of Cell Ageing*“ auf [Miquel *et al.* 1980]. Darin wurde beschrieben, dass durch ROS beschädigte Mitochondrien verstärkt Sauerstoffradikale generieren und der ROS-Effekt somit verstärkt wird.

Verschiedene Veröffentlichungen bestärkten diese Theorie. So wiesen z. B. Mitochondrien von alten Tieren eine höhere ROS-Produktion auf als junge Tiere [Sohal *et al.* 1990]. In einer weiteren Studie von Corbisier und Kollegen wurden isolierte Mitochondrien aus Fibroblasten alter Ratten in Zellen von jungen Tieren injiziert, bei denen der Alterungsprozess im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe viel schneller einsetzte [Corbisier und Remacle 1990].

Allerdings werden diese Theorien kontrovers diskutiert [Alexeyev 2009, Gems und Doonan 2009, Perez *et al.* 2009, Schulz *et al.* 2007, Sohal 2002], da reaktive Sauerstoffspezies nicht nur für das Auftreten von molekularen Schäden verantwortlich gemacht werden, sondern auch wichtige Signalmoleküle darstellen, die für biologische Funktionen in Zellen notwendig sind [Barja 1993, Chandel und Budinger 2007, Connor *et al.* 2005, Finley und Haigis 2009, Guzy *et al.* 2005, Guzy und Schumacker 2006, Kaelin 2005, Loh *et al.* 2009, Owusu-Ansah *et al.* 2008, Rhee *et al.* 2003, Ristow *et al.* 2009, Schulz *et al.* 2007, Veal *et al.* 2007].

1.2.3 Mitohormesis

Im Gegensatz zu den zuvor genannten Hypothesen steht die Mitohormesis-Theorie. Der Begriff Hormesis (griech. „Anregung, Anstoß“) wurde erstmals 1943 in der Literatur erwähnt [Southam 1943] und beschreibt ein Dosis-Wirkungs-Phänomen, welches positive Effekte nach Exposition eines gering konzentrierten Stressfaktors und negative Auswirkungen nach Stimulation mit höheren Dosen eines Stressors aufweist (Abbildung 3).

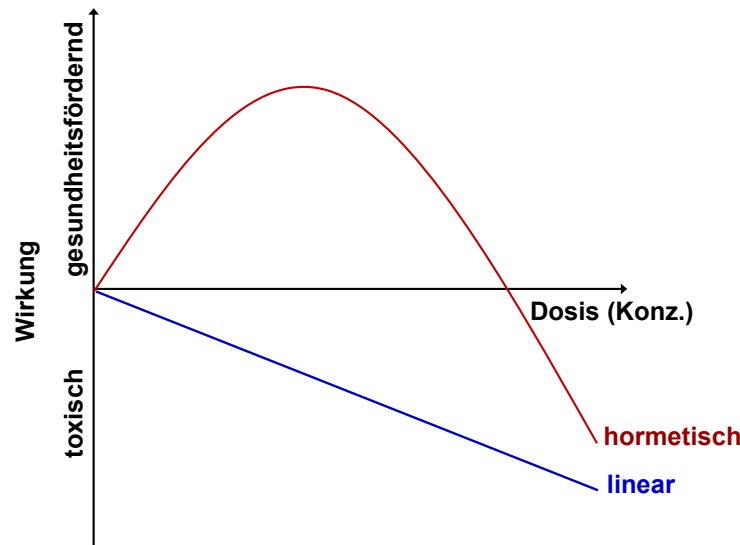


Abbildung 3: Hormesis vs. Lineare Dosis-Wirkungs-Kurve.

Laut der Hormesis-Theorie hat ein toxisches Agens in niedriger Konzentration positive Auswirkungen, während in hoher Konzentration ein Schaden überwiegt [Southam 1943]. Graphisch kann die Hormesis als eine inverse U-förmige Dosis-Wirkungskurve gekennzeichnet werden. Bei der linearen Dosis-Wirkungs-Kurve nehmen die negativen Effekte proportional zur Konzentration zu. Modifiziert nach: [Calabrese *et al.* 2011].

Nach dem Prinzip der Hormesis können geringe Mengen einer in höheren Konzentrationen toxisch wirkenden Substanz einen milden Stress ausüben, wodurch eigene Reparatur- und Stressabwehrsysteme vermehrt aktiviert werden. Dies führt nachfolgend zur Erhöhung der Stressresistenz [Gems und Partridge 2008] und zur Verlangsamung von Alterungsprozessen [Le Bourg 2009] sowie zur Lebensverlängerung [Neafsey 1990]. Erst in hohen Dosen überwiegen die negativen und schädlichen Effekte. Im *C. elegans* Modell konnte bereits eine hormetisch induzierte Langlebigkeit durch Behandlung mit gering dosierten schädlichen Substanzen bzw. mit mildem Stress nachgewiesen werden [Cypser und Johnson 2002, Hartwig *et al.* 2009, Le Bourg 2009, Yashin *et al.* 2001].

Mitochondrien sind Zellorganellen, welche den Großteil der Energie durch oxidative Phosphorylierung in der Zelle bereitstellen und dadurch auch die Hauptquelle von reaktiven Sauerstoffspezies darstellen. Demnach beschreibt die mitochondriale Hormesis die Theorie, dass eine erhöhte Aktivität der Mitochondrien und die daraus verstärkte ROS-Produktion die Stressabwehr steigert und die Lebenserwartung verlängert [Tapia 2006, Zarse *et al.* 2012]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Kalorienrestriktion [Nisoli *et al.* 2005], Glukoselimitation [Lin *et al.* 2002, Schulz *et al.* 2007], ein gestörter Insulin/IGF-1 Signalweg [Katic *et al.* 2007], eine Störung im mTOR-Signalweg [Bonawitz *et al.* 2007,

Kaeberlein *et al.* 2005, Kapahi *et al.* 2004, Vellai *et al.* 2003] und Sport [Chevion *et al.* 2003, Davies *et al.* 1982, Davis *et al.* 2012, Powers und Jackson 2008] den mitochondrialen Stoffwechsel stimulieren können. Dies bewirkt nachfolgend eine Erhöhung der Stressabwehr [Masoro 1998b, Tapia 2006, Zarse *et al.* 2012], wodurch die Lebenserwartung verlängert werden kann [Grandison *et al.* 2009, Holzenberger *et al.* 2003, Kappeler *et al.* 2008, Kenyon *et al.* 1993, Lin *et al.* 2002, Masoro 2005, Powers *et al.* 2006, Schulz *et al.* 2007, van Heemst *et al.* 2005]. Eine Supplementierung mit Antioxidantien verringert dabei die gesundheitsfördernden Effekte [Gomez-Cabrera *et al.* 2008, Lanza *et al.* 2008, Ristow *et al.* 2009].

Zusammenfassend zeigen diese Erkenntnisse, dass die adaptive Antwort infolge von geringen Dosen an ROS für eine gesundheitsfördernde bzw. lebensverlängernde Wirkung verantwortlich ist, während hohe Konzentrationen an ROS negative Effekte erzielen (Abbildung 4). Diese biphasische Wirkung in Hinblick auf reaktive Sauerstoffspezies wurde erstmals 2006 als Mitohormesis bezeichnet [Tapia 2006].

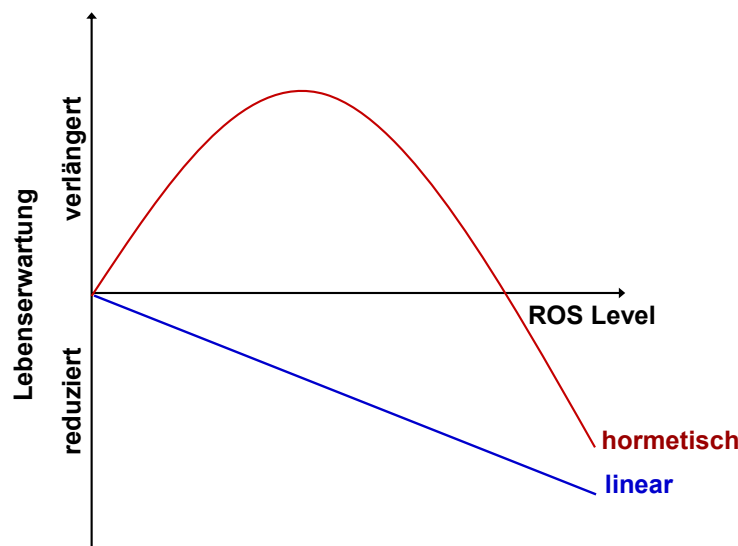


Abbildung 4: Mitohormetische Dosis-Wirkungsbeziehung für reaktive Sauerstoffspezies.

Bei der Mitohormesis-Theorie führen geringe Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu einer gesteigerten Lebenserwartung während sich hohe ROS-Konzentrationen negativ auf die Lebensdauer auswirken. Modifiziert nach [Gems und Partridge 2008].

1.3 Einfluss der Kalorienrestriktion auf die Lebenserwartung

In verschiedenen Spezies, von der Hefe bis zur Maus, konnte eine Verlängerung der Lebenserwartung infolge einer Kalorienrestriktion (KR) beobachtet werden [Dilova *et al.* 2007, Fontana *et al.* 2010b, Goodrick *et al.* 1990, Lin *et al.* 2002, Mair und Dillin 2008, Mair *et al.* 2005, Masoro 2005, McCay *et al.* 1935, Piper und Bartke 2008, Skorupa *et al.* 2008]. Selbst in Rhesusaffen wurde eine Verringerung der altersassoziierten Sterblichkeit durch Kalorienrestriktion nachgewiesen [Colman *et al.* 2009]. Auch beim Menschen gibt es Hinweise, dass eine Kalorienlimitation zur Verbesserung altersabhängiger Krankheiten wie z. B. Herz-Kreislauferkrankungen [Fontana *et al.* 2004], Diabetes [Fontana *et al.* 2010a] und Krebserkrankungen [Hursting *et al.* 2003] führt und somit die Lebenserwartung von Menschen positiv beeinflusst [Fontana *et al.* 2004, Fontana *et al.* 2007, Heilbronn *et al.* 2006, Ingram *et al.* 2006, Weindruch 2006].

Speziell im *C. elegans* Modell kann die KR-vermittelte Lebensverlängerung u. a. durch Bakterienverdünnung [Bishop und Guarente 2007b, Greer *et al.* 2007, Houthoofd *et al.* 2003, Klass 1977, Panowski *et al.* 2007], axenisches bzw. chemisch definiertes Medium [Houthoofd *et al.* 2002, Szewczyk *et al.* 2006], oder durch vollständiges Fehlen der Bakterien [Kaeberlein *et al.* 2006, Lee *et al.* 2006] erreicht werden. Auch eine Störung im Glukosestoffwechsel führt zu einer Verlängerung der Lebenserwartung von Wildtyp-Nematoden [Schulz *et al.* 2007]. Weiterhin gibt es Mutanten, welche aufgrund einer verminderten Pharynx-Pumpfrequenz nur über eine eingeschränkte Nahrungsaufnahme verfügen und daher eine längere Lebensspanne aufweisen [Avery 1993, Huang *et al.* 2004, Lakowski und Hekimi 1998].

Aus der Nahrungsbeschränkung entsteht folglich ein Energiedefizit, welches die mitochondriale Aktivität induziert [Lin *et al.* 2002, Nisoli *et al.* 2005, Schulz *et al.* 2007, Sharma *et al.* 2011, Zuin *et al.* 2010], um den Energiemangel zu kompensieren. Wie schon erwähnt, ist eine derartige Steigerung des mitochondrialen Stoffwechsels mit einer Lebensverlängerung assoziiert. Diese gesteigerte Lebenserwartung resultiert aus einer erhöhten Aktivität von ROS-entgiftenden Enzyme, sodass die endogenen Abwehrmechanismen verstärkt werden [Barros *et al.* 2004, Koizumi *et al.* 1987, Masoro 1998b, Pieri *et al.* 1992, Rao *et al.* 1990, Semsei *et al.* 1989, Sreekumar *et al.* 2002, Xia *et al.* 1995, Youngman *et al.* 1992].

Bereits in Nematoden konnte gezeigt werden, dass eine Glukoserestriktion zur Steigerung der mitochondrialen Respiration mit nachfolgender Erhöhung der ROS-Produktion führt [Schulz *et al.* 2007]. Dies hatte eine langfristig erhöhte Stresstoleranz durch verstärkte

antioxidative Enzymaktivitäten zur Folge, wodurch die Lebenserwartung verlängert wurde [Schulz *et al.* 2007].

1.4 Untersuchte pharmakologische Substanzen

1.4.1 D-Glucosamin

D-Glucosamin (2-Amino-2-Deoxy-D-Glukose; GlcN) ist ein Aminozucker, welcher ein natürlicher Bestandteil von Knorpel, Gelenkflüssigkeit und Bindegewebe ist, aber auch industriell aus Chitin hergestellt werden kann [Anderson *et al.* 2005]. Das körpereigene GlcN kann aus Glukose synthetisiert werden. Zunächst wird in der Glykolyse Glukose zu Fruktose-6-Phosphat umgewandelt. Bei Vorhandensein von Glutamin und der Glucosamin-Fruktose-6-Phosphat-Amidotransferase (GFAT) entsteht aus zwei bis fünf Prozent des Fruktose-6-Phosphats [Milewski 2002] das Glucosamin-6-Phosphat [Wu *et al.* 2001].

Exogen aufgenommenes GlcN wird durch Glukosetransporter in die Zellen aufgenommen [Uldry *et al.* 2002] und anschließend durch eine Hexokinase phosphoryliert. Aus dem dabei entstehenden GlcN-6-Phosphat kann durch die GlcN-6-Phosphat-Deaminase wieder das Fruktose-6-Phosphat gebildet werden [Wolosker *et al.* 1998]. Nach Acetylierung wird das GlcN-6-Phosphat als Vorläufer des Hexosamin-Signalweges zu Uridindiphosphat-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) konvertiert, welches zur Synthese von Proteoglykanen, Glykoproteinen und Glykolipiden genutzt wird (Abbildung 5). GlcN stimuliert somit die Proteoglykansynthese [Bassleer *et al.* 1992, Bassleer *et al.* 1998], hemmt den Knorpelabbau [Lin *et al.* 2008, Piperno *et al.* 2000] und besitzt eine entzündungshemmende Wirkung [Chan *et al.* 2005, Chiusaroli *et al.* 2011, Largo *et al.* 2003], weshalb es zur Reparatur und zum Wiederaufbau von geschädigtem Knorpelgewebe, zur Behandlung von Osteoarthritis [McAlindon *et al.* 2000] und als Nahrungsergänzungsmittel im Leistungssport eingesetzt wird.

Weiterhin kann UDP-GlcNAc verschiedene Signaltransduktionen in Zellen beeinflussen, da es enzymatisch an Proteine gekoppelt werden kann und somit deren Funktion verändert. Diese Proteinmodifikationen sind in verschiedenen zellulären Prozessen involviert und nehmen Einfluss auf die Transkription und Translation, die Nahrungs- und Stresssensorik, die neuronalen Funktionen und den Zellzyklus [Hart *et al.* 2011]. Daher wird GlcN in Zusammenhang mit chronischen Erkrankungen, wie z. B. Krebs, neurologischen

Erkrankungen und Diabetes mellitus diskutiert [Hart *et al.* 2011]. Es zeigte sich, dass eine kurzzeitige Verabreichung von hohen Dosen des Aminoszuckers in verschiedenen Modellorganismen [Marshall *et al.* 1991, Patti *et al.* 1999, Robinson *et al.* 1993] und auch beim Menschen [Hawkins *et al.* 1996, Monauni *et al.* 2000] zu einer akuten Beeinträchtigung des Glukosestoffwechsels führt, welche mit Stoffwechselstörungen des Diabetes Mellitus assoziiert ist. Im Gegensatz dazu trägt die Einnahme von geringeren GlcN-Konzentrationen zum Schutz vor Insulinresistenz und Adipositas bei [Barrientos *et al.* 2010]. Zudem sind beim Menschen keine negativen Nebenwirkungen durch eine chronische GlcN-Behandlung bekannt [Anderson *et al.* 2005, Simon *et al.* 2011].

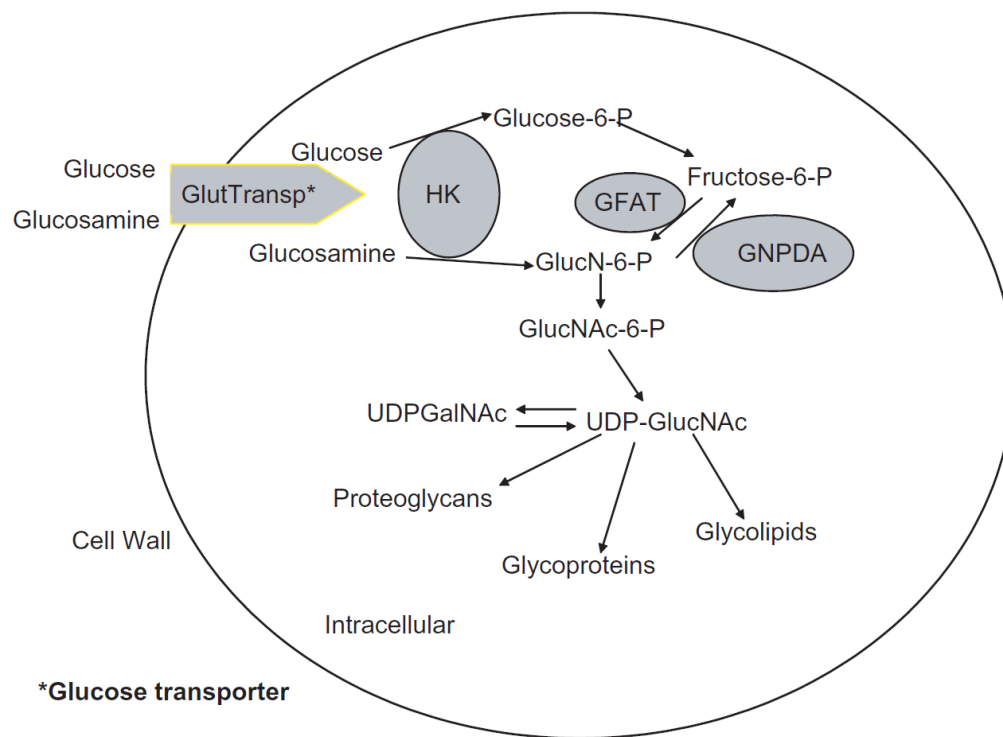


Abbildung 5: Stoffwechsel von Glucosamin.

Glukosetransporter sind als Pfeil dargestellt und die Schlüsselenzyme in grau hinterlegten Ellipsen gekennzeichnet.

Glucose-6-P: Glukose-6-Phosphat; Fruktose-6-P: Fruktose-6-Phosphat; GlucN-6-P: Glucosamin-6-Phosphat; GlucNAc-6-P: N-Acetyl-Glucosamin-6-Phosphat; UDPGalNAc: Uridindiphosphat (UDP)-N-Acetyl-Galactosamin; UDP-GlucNAc: UDP-N-Acetyl-Glucosamin; HK: Hexokinase; GFAT: Glucosamin-Fruktose-6-Phosphat-Amidotransferase; GNPDA: Glucosamin-6-Phosphat Deaminase. [Anderson *et al.* 2005].

1.4.2 Ritalin

Ritalin (Methylphenidat, MPH) ist eine betäubungsmittelrezeptpflichtige Substanz mit stimulierenden Wirkungen im zentralen Nervensystem. Es ist ein Piperidin-Derivat und strukturell mit den Amphetaminen verwandt [Challman und Lipsky 2000]. Ritalin kann schnell und vollständig im Darm absorbiert werden und die Blut-Hirnschranke durch seine hohe Fettlöslichkeit überwinden [Kimko *et al.* 1999]. Die Ausscheidung erfolgt größtenteils über den Urin als Ritalinsäure, welche keine oder nur eine geringe pharmakodynamische Aktivität besitzt.

Bei gesunden Menschen bewirkt Ritalin eine Anregung des autonomen Nervensystems mit Steigerung der Herzfrequenz und des Blutdrucks [Cooper *et al.* 2005]. Ferner interagiert Ritalin mit den Transportern für Neurotransmitter in der neuronalen Plasmamembran, wodurch die Aufnahme von Dopamin, Norepinephrin und Serotonin beeinträchtigt wird [Yano und Steiner 2007]. So kann Ritalin die Aufmerksamkeit erhöhen [Cooper *et al.* 2005], weshalb es zunehmend zur Leistungssteigerung eingenommen wird, Allerdings besitzt Ritalin ein erhöhtes Suchtpotential und viele Nebenwirkungen, wie Tachykardie, Herzrhythmusstörungen, Hypertonie, Schlafstörungen, Appetithemmung, Gewichtsverlust, Kopfschmerzen, Bauchschmerzen und erhöhtes Angstgefühl [Kimko *et al.* 1999, Leonard *et al.* 2004].

Ritalin ist ein weit verbreitetes Medikament zur therapeutischen Behandlung des Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Syndrom (ADHS), an dem 8-12 % der Kinder weltweit leiden [Biederman und Faraone 2005]. Diese psychische Erkrankung ist u. a. durch eine Störung im Dopaminhaushalt gekennzeichnet. Dabei konnte eine höhere Anzahl und Aktivität von Dopamin-Wiederaufnahmetransportern im Gehirn bei ADHS-Kranken festgestellt werden [Cheon *et al.* 2003, Dougherty *et al.* 1999, Krause *et al.* 2000, Larisch *et al.* 2006]. Ritalin blockiert diesen Dopamintransporter (DAT) [Dougherty *et al.* 1999, Volkow *et al.* 1999, Volkow *et al.* 1998], sodass weniger Dopamin in die Zelle wieder aufgenommen werden kann, wodurch sich die Dopaminkonzentration im synaptischen Spalt erhöht [Bymaster *et al.* 2002, Volkow *et al.* 2001, Volz 2008] (Abbildung 6). Folglich werden die Dopaminrezeptoren verstärkt aktiviert [Alburges *et al.* 2011, Rosa Neto *et al.* 2002, Volkow *et al.* 2007, Volz 2008] und dadurch die Reizweiterleitung optimiert. In mehreren Studien konnte die positive Wirkung von Ritalin bei ADHS bestätigt werden [Jadad *et al.* 1999, Koneski *et al.* 2011, Rappley 2005]. Weiterhin wird Ritalin zur Behandlung von Parkinson eingesetzt, einer neurodegenerativen Erkrankung, bei der es zum Absterben von dopaminergen Nervenzellen kommt [Olanow *et al.* 2003]. Hierbei

konnte gezeigt werden, dass Ritalin positive Effekte auf verschiedene Symptome der Parkinson-Erkrankung erzielen kann [Auriel *et al.* 2009, Devos *et al.* 2007, Pollak *et al.* 2007]. Auch Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen, wie Depressionen [Camacho und Ng 2006, Fisch 1985, Lavretsky *et al.* 2006, Macleod 1998, Olin und Masand 1996, White *et al.* 1992], Apathie [Herrmann *et al.* 2008, Padala *et al.* 2007, Teixeira und Caramelli 2006] und Demenz [Goforth *et al.* 2004, Rahman *et al.* 2006], können durch die Einnahme von Ritalin profitieren.

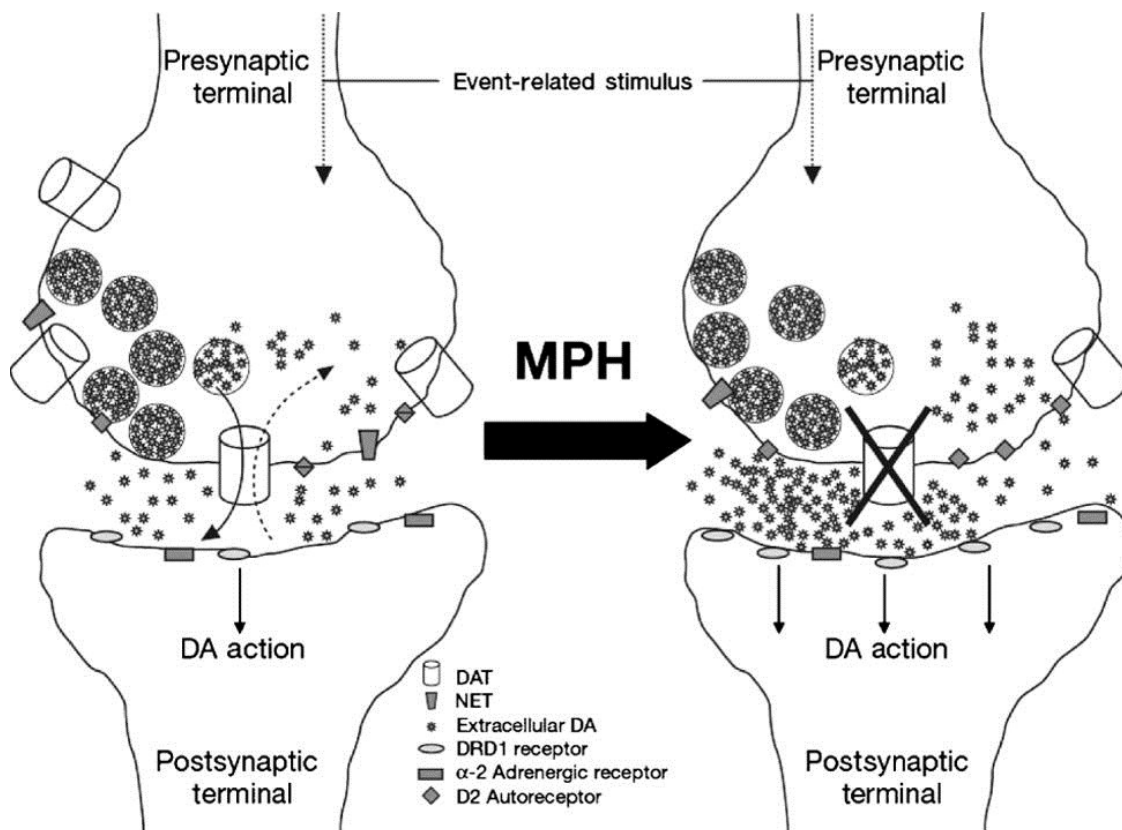


Abbildung 6: Wirkung von Ritalin (MPH) auf das dopaminerge System.

Das linke Bild stellt eine Nervenzelle im Striatum bei ADHS ohne MPH-Behandlung dar. Es zeigt relativ geringe Dopaminlevels, eine hohe DAT-Aktivität und eine Hemmung des D2-Autorezeptors.

Das rechte Bild repräsentiert ein Neuron nach einer Ritalin-Behandlung. Es zeigt die Blockierung des DAT mit einer gesteigerten Akkumulation des Dopamins im Extrazellulärraum. MPH wirkt durch die Hemmung des DATs, die Enthemmung des D2-Autorezeptors an der präsynaptischen Membran und durch die Aktivierung des D1-Rezeptors an der postsynaptischen Membran. Folglich wird das Dopaminsignal verstärkt, wodurch sich die Aufmerksamkeit, die kognitiven Fähigkeiten und die Hyperaktivität verbessern.

DA: Dopamin; DAT: Dopamintransporter; NET: Norepinephrintransporter; DRD1: Dopaminrezeptor D1. [Wilens 2008].

1.5 Zielsetzung

In dieser Arbeit wurden die Effekte von zwei pharmakologischen Substanzen auf die Lebenserwartung und den Stoffwechsel im *C. elegans* Modell untersucht, welche bereits weltweit als Ergänzungsmittel oder Medikament beim Menschen eingesetzt werden. Es wurden die Auswirkungen einer Glucosamin (GlcN) bzw. Ritalin-Exposition auf die Lebenserwartung und Stressresistenz in *C. elegans* dargelegt und die zugrunde liegenden molekularen Hintergrundmechanismen analysiert.

In der Literatur gibt es einige Hinweise, dass Glucosamin (GlcN), ähnlich wie 2-Deoxy-D-Glukose (DOG), den Glukosestoffwechsel beeinträchtigen kann [Balkan und Dunning 1994, Barzilai *et al.* 1996, Van Schaftigen 1995, Vandercammen und Van Schaftigen 1991, Virkamaki und Yki-Jarvinen 1999]. Für DOG wurde bereits eine Glukoserestriktionsvermittelte Lebensverlängerung in *C. elegans* durch Induktion der Mitochondrien nachgewiesen [Schulz *et al.* 2007]. Allerdings konnte in einer Studie von Minor und Kollegen gezeigt werden, dass eine chronische DOG-Aufnahme die Lebenserwartung von Ratten verringert [Minor *et al.* 2010]. Zudem ist eine Verabreichung von DOG beim Menschen nicht zugelassen. Der Aminosucker GlcN hingegen wird bereits im Menschen als Nahrungsergänzungsmittel bzw. als Medikament gegen Osteoarthritis eingesetzt. Deshalb soll in dieser Arbeit zunächst überprüft werden, ob GlcN ähnliche Effekte wie DOG in den Nematoden ausüben kann, um in nachfolgenden Experimenten die Auswirkungen einer GlcN-Verabreichung in höheren Tieren, wie z. B. Mäusen zu untersuchen.

Eine Behandlung mit Ritalin in humanen Hepatoma-Zellen (HepG2-Zellen) führte in einem zuvor durchgeführten *in vitro* Zellscreening zu einer erhöhten ATP-Produktion, was auch auf eine verstärkte Aktivierung der Mitochondrien schließen lässt. Deshalb wurden die Auswirkungen für beide Substanzen auf diverse Stoffwechsel- und Lebensparameter in *C. elegans* analysiert und die Relevanz verschiedener Stress-regulierender Gene mit Hilfe von Mutantenstämmen erprobt. Schwerpunkt lag hierbei auf dem mitochondrialen Stoffwechsel, dem Einfluss des oxidativen Stresses und der Theorie der mitochondrialen Hormesis.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Medien, Puffer und Lösungen

MQ™-Wasser

MQ™-Wasser ist frei von Verunreinigungen durch Ionen, organischem Material, Pyrogene und Nukleasen und wurde zum Herstellen der Medien, Puffer und Lösungen verwendet.

NGM (Nematode Growth Medium) – Agar

NG-Agar	17,0 g/l
Pepton	2,5 g/l
NaCl	3,0 g/l
autoklavieren, auf 50 °C temperieren	
sterile Zugabe von:	
1 M CaCl ₂	0,5 ml
5 mg/ml Cholesterol	1,0 ml
1 M MgSO ₄	1,0 ml
1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0	25,0 ml
Nystatin	5 ml
evtl. Streptomycin	200 mg/l
evtl. Ampicilin	100 mg/l

LB-Agar

Bacto-tryptone	10 g
Bacto-yeast	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g

DYT-Medium für die OP50 Kultur

In 500 ml MQ™ Wasser wird Folgendes in einem Schüttelkolben gelöst:

Hefe-Extrakt	5,0 g
Pepton	8,0 g
NaCl	2,5 g

autoklavieren

Agarose

2 % Agarose: 2 g in 100 ml S-Puffer

aufkochen, Zugabe von MQ™ Wasser zum Ausgleich der verdampften Flüssigkeit

S-Puffer

NaCl	5,85 g/l
K ₂ HPO ₄	1,00 g/l
KH ₂ PO ₄	6,00 g/l

pH 6,0

autoklavieren

S-basal-Puffer: sterile Zugabe von 10 mM MgSO₄ und 1 ml/l Cholesterol (5 mg/ml)

Kaliumphosphatpuffer

KH ₂ PO ₄	0,8 mol/l
K ₂ HPO ₄	0,2 mol/l

pH 6,0

Nystatin-Lösung

Ammoniumacetat	115,6 g lösen in 200 ml MQ™ Wasser
Ethanol 96 %	200 ml
Nystatin	4 g

sterilfiltrieren

Inhibition Cocktail:

4,5 ml Sörensen-Puffer (KH_2PO_4 / $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH 7,4)
 20 μl 0,5 M EDTA
 50 μl 200 mM NaF
 50 μl 200 mM Na_3VO_4
 500 μl 10x Complete (Protease-/ Phosphatase- Inhibitorenmix)
 25 μl 200 mM PMSF (erst kurz vor der Verwendung zugeben)

Lysepuffer zur DNA-Isolierung

20 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 5 mM EDTA
 400 mM NaCl
 1 % SDS
 400 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K (Stammlösung 20 mg/ml in H_2O)

TE-Puffer zur DNA-Isolation

10 mM EDTA
 200 mM Tris-HCl (pH 8,0)

Tabelle 1: Puffer und Lösungen für den Western Blot

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Anodenpuffer I	0,3 M Tris; 20 % Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris ; 20 % Methanol
Kathodenpuffer	40 mM 6-Aminohexansäure; 0,01 % SDS; 20 % Methanol
3x Laemmli	150 mM Tris-HCl; 30 % Glycerol; 6 % SDS; 0,45 % Bromphenolblau
5x Laufpuffer	3 % Tris; 14,4 % Glycin; 0,5 % SDS
Ponceau-Färbelösung	0,2 % Ponceau S in 3 %-iger Trichloressigsäure
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-Base; pH 6,8
10-fach TBST	200 mM Tris-Base (pH 7,6); 1,37 M NaCl; 1 % Tween 20
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-Base; pH 8,8

Tabelle 2: Herstellung der Polyacrylamidgele für den Western Blot

Zusätze	Sammelgel (4 %)	Trenngel (10 %)
30 % Acrylamid	1,3 ml	3,3 ml
Gelpuffer	2,5 ml	2,5 ml
Wasser	6,1 ml	4,1 ml
10 % APS	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl
SDS	0,1 ml	0,1 ml

Tabelle 3: Primär und Sekundärantikörper für Western Blot

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Firma
Primärantikörper			
Phospho-AMPK (62 kDa)	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling
Phospho-p38 (43 kDa)	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling
α-Tubulin (50 kDa)	1:1000	Maus	Sigma-Aldrich
Sekundärantikörper			
Anti-Kaninchen (HRP-konjugiert)	1:3000	Ziege	Sigma-Aldrich
Anti-Maus (HRP-konjugiert)	1:3000	Ziege	Cell Signaling

2.1.2 Verwendete Organismen

Es wurden folgende *C. elegans* Stämme verwendet: Wildtyp (N2); *aak-2* [RB754 (ok524)]; *sir-2.1* [VC199 (ok434)]; *pmk-1* [KU25 (km25)]; *skn-1* [EU31 (zu135)]; *skn-1* [EU1 (zu67)]; *daf-16* [CF1038 (mu86)]; *dat-1* [RM2702 (ok157)]; *cat-2* [CB1112 (e1112)]; *eat-2* [DA1113 (ad1113)]; CL4176 [smg-1(cc546) I; dvls27 X]; CL802 [smg-1(cc546) I; rol-6(su1006) II]; CX3596 [kyls128 lin-15B(n765) X.]. Diese wurden, wie auch die *E. coli* Bakterien OP50 (i) vom *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC; University of Minnesota, USA) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 4: Mammalische Orthologe zu Mutationen in *C. elegans*.

<i>C. elegans</i> Mutation	Mammalisches Ortholog
AAK-2	AMPK
SIR2.1	SIRT1 (NAD ⁺ -abhängige Deacetylase)
PMK-1	p38 MAPK
SKN-1	NRF2
DAF-16	FOXO

2.1.3 Software

- Microsoft® Office Version 2007
- Microsoft® Windows Media Player
- Oxygraph Plus V1.10
- ProgRes® CapturePro
- Danio Track
- Motic Images Plus 2.0
- Graph Pad Prism 9
- JMP 9 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)
- Zeiss LSM Software 3.2
- Endnote X6

2.2 Methode

2.2.1 Bakterienkultur *E. coli*

Escherichia coli (*E. coli*) Bakterien wurden auf LB-Agar ausgestrichen und vermehrten sich über Nacht bei 37 °C. Sie dienten als Grundlage für die Kultivierung von *E. coli* in DYT-Medium, welches mit einer einzelnen Kolonie inokuliert und für ca. 14 Stunden bei 37 °C inkubiert wurde. Anschließend erfolgte die Aufkonzentrierung zu zweifach oder zehnfach konzentrierten Bakterien, welche bei 4 °C gelagert und einen Monat verwendet werden konnten [Stiernagle 2006].

Zum Ausschluss der Metabolisierung von Substanzen durch die Bakterien wurde für einige Experimente das bewachsene DYT Medium für 45 Minuten bei 65 °C erhitzt und anschließend bei Raumtemperatur abgekühlt. Durch diese Inaktivierung wurde die Vermehrung der Kulturen gestoppt. Damit die Bakteriensuspension als Nahrungsquelle für *C. elegans* ausreichend blieb, wurde sie 20-fach aufkonzentriert.

Das Beimpfen der Agarplatte mit 500 µl der Bakteriensuspension erfolgte jeweils einen Tag vor Verwendung. Da dieser Bakterienstamm Uracil auxotroph ist, wurde eine Überwucherung der Agarplatte verhindert.

Für die Erhaltung sowie zur Analyse der Lebensspanne wurden lebende, zweifach konzentrierte Bakterien verwendet. Um Kontaminationen bei Langzeitversuchen zu vermeiden, wurde den Agarplatten Streptomycin (200 µg/ml) zugegeben und OP50i Bakterien verwendet, welche Streptomycin-resistent sind.

2.2.2 *C. elegans*

2.2.2.1 Erhaltung

Die Haltung der Nematoden erfolgte nach dem Protokoll von Stiernagle [Stiernagle 2006] bei 20 °C auf NGM-Agarplatten (9 cm Ø). Als Nahrungsquelle dienten *E. coli* OP50 Bakterien [Brenner 1974], welche einen Tag zuvor zum Anwachsen auf Agarplatten gegeben wurden. Für die Erhaltung wurden etwa acht Larven des L4-Stadiums mit einem abgeflammt und erkalteten Platinspatel von der Agarplatte gepickt und auf eine neue, mit *E. coli* beimpfte, Platte gesetzt. Wurden die Würmer für Versuche benötigt, wurden diese

mit S-Puffer vom Agar abgespült und in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Ihre Entwicklungsgeschwindigkeit hing von der Umgebungstemperatur und von eventuell vorhandenen Mutationen ab. Wildtyp-Nematoden benötigten bei 20 °C ca. fünf Tage um synchronisiert werden zu können.

2.2.2.2 Synchronisierung

Experimente wurden stets mit einer homogenen Wurmpopulation gleichen Alters durchgeführt. Dies wurde durch die Erhaltung von noch nicht geschlüpften Eiern gewährleistet.

Die Nematoden ungleichen Alters wurden von den Agarplatten mit sterilem MQ™ Wasser abgespült. Anschließend wurden die an der Oberfläche des NGM-Agars haftenden Eier mit einem gläsernen Drigalski-Spatel abgekratzt, in einem 15 ml-Röhrchen gespült, abzentrifugiert (1 min, 1300 x g, 20 °C) und noch dreimal gewaschen. Die separierten Eier wurden dann gleichmäßig auf neue, mit *E. coli* beimpfte, Platten aufgeteilt. Die Fadenwürmer benötigten etwa 64 Stunden um sich zur L4-Larve zu entwickeln. Dieses Larvenstadium diente als Ansatzpunkt für anschließende Inkubationen der Wurmpopulation.

2.2.2.3 Inkubation

Die Behandlung der Würmer mit der zu untersuchenden Substanz erfolgte durch deren Zugabe im NGM-Agar. Die Endkonzentration von GlcN im Agar betrug dabei 100 µM (in Wasser gelöst), von Ritalin 5 µM (in Wasser gelöst), von N-Acetyl-Cystein 1 mM (NAC, in Wasser gelöst), von Butylhydroxyanisol 10 µM (BHA, in 0,1 % DMSO gelöst), von Rotenon 1 µM (in 0,1 % DMSO gelöst) und von Paraquat 10 mM (in Wasser gelöst). Eine entsprechende Kontrollgruppe wurde parallel mit dem Lösungsmittel der Substanz mitgeführt. Für die Lebenszeitanalysen mit NAC oder BHA wurden die Nematoden über vier Generationen mit bzw. ohne die Antioxidantien vorinkubiert, bevor sie synchronisiert wurden. Wenn die Nematoden länger als einen Tag mit einer Substanz inkubiert wurden, wurden die Fadenwürmer jeden Tag von den Agarplatten mit S-Puffer gespült, dreimal gewaschen (je 1 min, 100 x g, 20 °C) und auf neue Bakterien-beimpfte Platten gesetzt. Als Nahrungsquelle dienten zweifach konzentrierte OP50, welche am Tag zuvor auf 9 cm großen Agarplatten pipettiert wurden.

2.2.2.4 Ernten der *C. elegans*- Kultur

Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Nematoden mit eisgekühltem S-Puffer von den Agarplatten gewaschen, in ein 15 ml-Röhrchen gesammelt, bei 4 °C abzentrifugiert (1 min, 100 x g) und noch zweimal gewaschen, bevor sie in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt wurden. Nach Entfernung des kompletten Überstandes, wurden die Wurmpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.2.5 Analyse der Lebensspanne

Die Bestimmung der Lebensspanne erfolgte am Stereo-Dissektionsmikroskop. Hierbei bezog man sich auf die neuromotorische Reaktion von *C. elegans* auf einen physischen Reiz, welcher durch Antippen mit dem Platinspatel erzeugt wurde. Wenn nach zwei bis drei Berührungen am Kopf und der Schwanzregion keine kontraktile Reaktion erfolgte, wurde der Wurm als tot bewertet und von der Platte entfernt. Die lebenden, toten sowie zensierten Tiere wurden notiert und die Überlebensrate ermittelt.

Die Lebenszeitanalysen wurden auf 5 cm großen Agarplatten durchgeführt. Als Nahrungsquelle dienten zweifach konzentrierte OP50, beziehungsweise OP50i (ab Tag 12). Synchronisierte Populationen von L4-Larven wurden 64 Stunden nach dem Schlüpfen auf die Platten transferiert. Zur Erhaltung der Alterssynchronisation wurden die Tiere so lange täglich auf frische, angeimpfte Agarplatten transferiert bis sich keinerlei Larven mehr auf den Platten befanden. Anschließend gab es einen Transfer-Zähl-Rhythmus von zwei Tagen, um Materialverbrauch und Stress für die Tiere zu reduzieren. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt.

2.2.2.6 Analyse der Stressresistenz

Der Stressassay untersuchte die Wirkung eines zuvor inkubierten Stoffes auf die Resistenz gegenüber Paraquat-induziertem oxidativem Stress. Die Konzentration von Paraquat lag in einem für *C. elegans* toxischen Bereich von 10 mM. Paraquat erzeugt in der Zelle Superoxidradikale [Bonneh-Barkay *et al.* 2005], verschiebt so die Redoxkapazität der Zelle und führt zu Dysfunktionen und typischen Alterungserscheinungen. Infolgedessen starben die Nematoden innerhalb von 5 bis 8 Tagen.

Für den Paraquat-Stressassay wurden die alterssynchronisierten L4-Larven auf 9 cm große Behandlungsplatten mit bzw. ohne GlcN gespült und für sechs Tage vorbehandelt (siehe 2.2.2.3). Nach dieser Vorinkubation wurden je 100 Würmer auf eine 5 cm große Paraquatplatte transferiert. An jedem darauf folgenden Tag wurden die toten und lebenden Würmer gezählt und die Lebenden auf eine frische Paraquatplatte gesetzt. Als Nahrungsquelle dienten 20-fach konzentrierte, hitzeinaktivierte Bakterien. Die Versuche wurden, wie bei den Analysen der Lebensspanne, als Triplikate geführt.

2.2.2.7 Paralyse

Die Methode zur Untersuchung der A β -induzierten Paralyse erfolgte nach Dostal [Dostal und Link 2010] und Diomedea [Diomedea *et al.* 2010] mit minimalen Veränderungen. Es wurde der Stamm CL4176 [smg-1(cc546) I; dvIs27 X] verwendet, der ein myo-3/A β Transgen besitzt, welches durch eine Temperaturerhöhung exprimiert wird und zur Paralyse führt. Daher wurde dieser Stamm zur Erhaltung bei 16 °C kultiviert. Nach der Synchronisation wurden die Eier auf 9 cm große Agarplatten mit bzw. ohne Substanz transferiert und 54 Stunden später in einen 25 °C warmen Brutschrank gestellt, um die Expression des Transgens zu induzieren. Hierbei war es wichtig, dass die Nematoden sich im L3 Stadium befanden, da der myo 3-Promotor in L4 Larven nur noch vermindert exprimiert wird. Weitere 12 bis 16 Stunden später wurden 100 Nematoden auf je eine 5 cm große Platte mit bzw. ohne GlcN gesetzt (Dreifachbestimmung). 30 Stunden nach der Temperaturerhöhung wurden die paralyisierten Nematoden alle zwei Stunden gezählt. Als Kontrollstamm wurde CL802 [smg-1(cc546) I; rol-6(su1006) II] verwendet, welcher genauso behandelt wurde, aber nicht paralyisierte. Als Positivkontrolle wurde Coffein (Endkonzentration 3,6 mM) verwendet, da für diese Substanz bereits eine verringerte Paralyse gezeigt werden konnte [Dostal *et al.* 2010].

2.2.2.8 Bestimmung der Glukoseaufnahme

Für diesen Versuch wurden 24 Stunden alte Nematoden verwendet, welche mit S-Puffer von den Platten gespült und einmal gewaschen wurden (1 min, 400 x g). Anschließend wurden sie auf 4 cm große und mit Agarplatten gesetzt, welche einen Tag zuvor mit einem Mix aus Bakterien (20-fach) und radioaktiv markierter U-[¹⁴C] 2-Deoxy-D-Glukose

(spezifische Aktivität 266 mCi/mmol; Endkonzentration 3,8 μ M bzw. 1 μ Ci/ml) beimpft wurden. Als Positivkontrolle wurde hierbei Cytochalasin B (Endkonzentration 10 μ M) verwendet, ein bekannter Hemmer des Glukosetransports [Lewko *et al.* 2005]. Die Nematoden wurden für drei Stunden mit bzw. ohne GlcN vorbehandelt, danach mit S-Puffer gewaschen und für eine Stunde mit radioaktiver 2-Deoxy-D-Glukose inkubiert. Anschließend wurden die Würmer erneut von den Platten gespült, dreimal gewaschen und für eine Stunde auf große Erhaltungsplatten, welche zuvor mit 1 ml Bakterien beimpft wurden, gesetzt. Nachdem die Nematoden mit kaltem S-Puffer von diesen Platten gespült und zweimal gewaschen wurden, wurden sie als Pellet in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Einen Tag später wurden die Nematoden mithilfe des Retsch-Aufschlussgeräts (Schwingmühle) und 300 μ l kalten S-Puffer zermahlen (4x 1 min, je 1 min Pause dazwischen). Der Überstand wurde in ein gewogenes Reaktionsgefäß überführt. Die Würmer wurden nochmals mit 300 μ l kalten S-Puffer gewaschen und anschließend ebenfalls in das Reaktionsgefäß überführt und erneut gewogen. Von dieser Suspension wurden 400 μ l für die Radioaktivmessung genutzt. Dazu wurde diese Suspension mit 4,6 ml Scintillationslösung versetzt, zehn Sekunden gevortext und nach einstündiger Ruhezeit im Scintillationszähler gemessen. Die restliche Wurm suspension wurde für die Proteinbestimmung nach Bradford verwendet (siehe 2.2.2.25).

2.2.2.9 Bestimmung der Glukoseoxidation

Die Bestimmung der Glukoseoxidation erfolgte nach Schulz *et al.* mit kleineren Veränderungen [Schulz *et al.* 2007]. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Nematoden mit S-Puffer von den Agarplatten gespült, gewaschen und zusammen mit radioaktiver U-[14 C] D-Glukose (spezifische Aktivität 300 mCi/mmol; Endkonzentration 17,1 μ M bzw. 5 μ Ci/ml) und nicht radioaktiv markierter Glukose (Endkonzentration 0,5 mM) in 4 cm große Petrischalen gegeben. Zu jeder dieser Schalen wurde eine weitere kleine Petrischale mit 600 μ l 0,1 M KOH vorbereitet, mithilfe dieser das Kohlenstoffdioxid eingefangen wurde. Diese beiden Schalen wurden nun ohne Deckel in eine 10 cm große Petrischale gestellt, welche mit Parafilm luftdicht verschlossen wird.

Nach zwei Stunden bei 20 °C wurde die Flüssigkeit aus jeder KOH-Platte entnommen, mit Scintillationslösung versetzt und in den Scintillationszähler gestellt, um die Menge des eingefangenen 14 CO₂ zu bestimmen.

Die Nematoden wurden von den S-Puffer-Platten entnommen, zweimal gewaschen und als Pellet in einem vorgekühlten Eppendorfgefäß durch flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Einen Tag später wurden die Nematoden mithilfe des Retsch-Aufschlussgeräts (Schwingmühle) und 500 µl kalten S-Puffer zermahlen (4x 1 min, je 1 min Pause). Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (siehe 2.2.2.25).

2.2.2.10 ATP-Bestimmung

Die quantitative Bestimmung des Adenosintriphosphat-Gehaltes wurde analog der bereits in der Literatur beschriebenen Protokolle durchgeführt [Kumsta *et al.* 2011, Yang *et al.* 2002, Yang und Hekimi 2010]. Nach der entsprechenden Inkubation (siehe 2.2.2.3), wurden die Wurmpellets (je Behandlung drei Pellets) geerntet (siehe 2.2.2.4) und unter ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff gemörsernt. Nach dem Zermahlen der Pellets wurden die Wurm suspensionen in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Pellets sollten dabei stets gefroren bleiben, um die Aktivität der ATPase zu unterbinden. Eine zuvor auf 99 °C erwärmte 4 M Guanidin-Salzlösung wurde nun direkt auf die Wurm suspensionen gegeben, um ebenfalls die ATPase zu inaktivieren. Die Proben wurden für 15 Minuten bei 99 °C und 1400 rpm im Thermomixer erhitzt und danach für 30 Minuten bei 4 °C und 13200 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und während des gesamten Prozesses stets auf Eis gehalten. Die Proben wurden 1:200 mit MQ™-Wasser verdünnt und auf eine 96-Wellplatte (weiße Lumineszenzplatte mit nicht-transparentem Boden, Greiner) pipettiert. Des Weiteren wurde eine ATP-Standardreihe hergestellt (50, 100, 200, 300, 500, 1000, 2000 nmol/l), aus deren Eichgeraden sich die Probenwerte errechnen ließen. Es wurden 50 µl CellTiter-Glo® Reagenz (Promega) in jedes Well pipettiert und die abgedeckte Platte für 40 Minuten auf einem Plattenschüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Lumineszenzmessung mit dem Mikroplattenleser bei einer Wellenlänge von 562 nm. In dem verwendeten Kit CellTiter-Glo® war eine Mischung aus Luciferin und Luciferase enthalten.

Das Prinzip des ATP-Versuchs basiert auf der Luciferin-Luciferase-Reaktion, bei der unter ATP-Verbrauch Oxyluciferin entsteht und Chemilumineszenz auftritt (Abbildung 7). Anhand der Lumineszenzintensität kann folglich der Gehalt an ATP bestimmt werden.



Abbildung 7: Prinzip der ATP-Bestimmung.

Nach der Proteinbestimmung mittels BCA-Test wird der ATP-Gehalt auf das Protein normalisiert (siehe 2.2.2.25).

2.2.2.11 Bestimmung der Respirationsrate

Die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs erfolgte analog Schulz und Kollegen [Schulz *et al.* 2007]. Für die Messung der Respiration wurden die Nematoden ab dem L4-Larvenstadium für die entsprechenden Zeitpunkte mit bzw. ohne Substanz als Dreifachbestimmung inkubiert (siehe 2.2.2.3).

Die Messung erfolgte an einer Sauerstoffelektrode vom Clark-Typ (Hansatech). Die Platin-Kathode wurde dabei mit einem Tropfen 3 M KCl-Lösung benetzt und mit einem 20 x 20 mm großen Zigarettenpapier (Elektrolyt-Brücke und Spacer) bedeckt. Auf das Zigarettenpapier wurde eine 25 x 25 mm große Teflonmembran gelegt. Die Silber-Anode wurde ebenfalls mit ein paar Tropfen der Elektrolytlösung versehen. Dabei sollte sich die Adhäsion des Teflons an das getränkte Papier ohne Unterbrechung des Flüssigkeitsfilmes über die ganze Fläche erstrecken. Ein O-Ring-13-g wurde mit Hilfe eines Applikators auf die Kathodenkuppel gestülpt, sodass Teflonmembran und Papier ohne Luftblasen über der Kathode gespannt waren. Schließlich wurde der Reaktionsraum auf die Elektrodenplatte geschraubt, mit 1 ml Wasser gefüllt und bei 20 °C kalibriert. Es folgte die Zugabe von Stickstoff, um den Sauerstoff-Nullwert zu definieren. Danach wurde mit 1 ml S-Puffer die Kammer für 45 Minuten äquilibriert.

Nach Kalibrierung der Messkammer, wurden die Würmer mit S-Puffer von den Inkubationsplatten abgespült, zweimal gewaschen und anschließend gemessen. Dazu wurde 1 ml der Nematodensuspension in die Messkammer gegeben und der Sauerstoffverbrauch für zehn Minuten mit Hilfe des Programms Oxygraph Plus aufgezeichnet. Nach dieser Messung wurde die Nematodensuspension mit einer Glaspasteurpipette aus der Kammer gesaugt und in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt sowie auf Eis gelagert.

Nach Messung aller Proben erfolgte die Sonifizierung (3 x 10 Zyklen, 50 %) der Nematodenpellets. Anschließend wurde nach zehnminütiger Zentrifugation (4 °C, 12000 x g) der Überstand abgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt, wobei das Gewicht der eingesetzten Proteinmenge ermittelt wurde. Es folgte die Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 2.2.2.25), sodass der Sauerstoffverbrauch auf das eingesetzte Protein normalisiert werden konnte.

2.2.2.12 Bestimmung der mitochondrialen ROS-Produktion

Um die mitochondriale ROS-Produktion zu quantifizieren, wurde ein kommerziell erwerblicher Farbstoff verwendet, welcher im reduzierten Status in die Mitochondrien eindringt (MitoTracker Red CM-H2XRos; Invitrogen). Dieser nicht-fluoreszierende Stoff wird in den Mitochondrien durch reaktive Sauerstoffspezies oxidiert, wodurch er zu einem Fluoreszenzfarbstoff umgewandelt wird. Die Fluoreszenzintensität nimmt proportional zur mitochondrialen ROS-Produktion zu und kann in einem Fluorometer gemessen werden (Anregung 570 nm; Emission 620 nm). Die oxidierte Form des Farbstoffes kann laut Hersteller die Mitochondrien nun nicht mehr verlassen.

Die Quantifizierung der reaktiven Sauerstoffspezies in den Mitochondrien erfolgte nach dem Protokoll von Zarse und Kollegen [Zarse *et al.* 2012]. Die vorbehandelten Nematoden (siehe 2.2.2.3) wurden von ihren Inkubationsplatten auf neue Agarplatten gespült, welche zuvor mit 500 µl hitzeinaktivierten Bakterien (Wasserbad, 65 °C, 45 min) und 100 µl Farbstoff (Endkonzentration 0,5 µM) beimpft wurden. Nach zweistündiger Inkubation erfolgte eine einstündige Auswaschphase auf frischen Behandlungsplatten um Messwertverfälschungen aufgrund einer zu hohen Farbstoffmenge zu vermeiden. Anschließend wurden die Würmer jeder Behandlung auf acht Wells einer schwarzen 96-Wellplatte verteilt und die Fluoreszenz im Well-Scanning-Modus mittels eines Fluorometers (Emission 610 nm) gemessen.

Um dieses Fluoreszenz-Signal auf die Proteinmenge beziehen zu können, wurden die Würmer nach der Messung aus den einzelnen Wells pipettiert, sonifiziert (3 x 10 Zyklen, 50 %) und für zehn Minuten zentrifugiert (4 °C, 12000 x g). Der Überstand wurde abgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt, wobei das Gewicht der eingesetzten Proteinmenge ermittelt wurde. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (siehe 2.2.2.25). Als Positivkontrolle dienten Rotenon-behandelte Würmer (1 µM), da Rotenon als Komplex-1 Hemmer oxidativen Stress induzieren kann [Sherer *et al.* 2003, Testa *et al.* 2005].

2.2.2.13 Quantifizierung von Wasserstoffperoxid

Die quantitative Messung von Wasserstoffperoxid beruht auf der Reaktion der Amplex Red Reagenz (10-Acetyl-3,7-Dihydroxyphenoxazin) mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in Gegenwart der Peroxidase („*horseradish peroxidase*“). Es entsteht das rot fluoreszierende

Oxidationsprodukt Resorufin, welches durch Fluoreszenzemission bei $\lambda = 585$ nm gemessen werden kann (Abbildung 8).

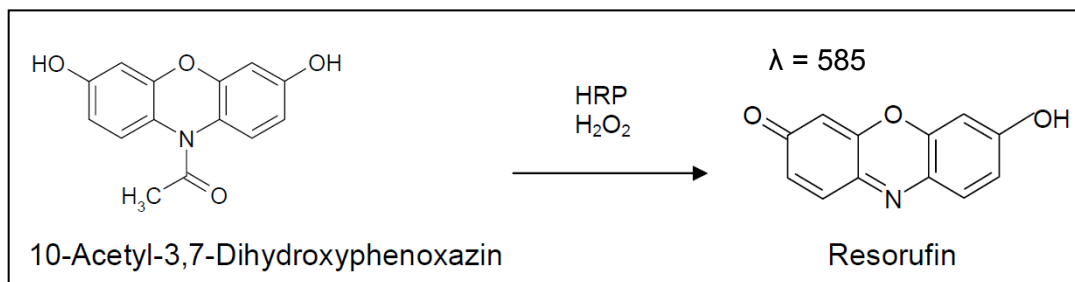


Abbildung 8: Prinzip der H₂O₂-Quantifizierung.

Die Quantifizierung des Wasserstoffperoxids in *C. elegans* erfolgte nach dem Protokoll von Zarse und Kollegen [Zarse *et al.* 2012]. Die vorbehandelten Würmer (siehe 2.2.2.3) wurden mit 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) von den Agarplatten abgespült, zweimal gewaschen und mit einem Volumen von 1,5 ml in eine Plexiglaskammer (analog der Respirationsmessung, 20 °C) pipettiert. Zunächst wurde nur Amplex Red (1 μ M) ohne Peroxidase hinzugefügt, um einen nicht-spezifischen Anstieg auszuschließen. Nach der Zugabe von 1 U/ml der Peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) folgte eine 20-minütige Fluoreszenzmessung (Exzitation 571 nm; Emission 585 nm) im Überstand durch ein laserbasiertes Fluorimeter (LF402 ProLine, IOM, Berlin, Deutschland). Um den Wasserstoffperoxidgehalt quantitativ bestimmen zu können, wurden H₂O₂-Standards (0; 10; 20; 50; 100 nM) mitgeführt.

Nach der Messung wurden die Nematoden aus der Kammer entnommen und für die folgende Proteinbestimmung (Bradford, siehe 2.2.2.25) auf Eis gestellt. Nach der Sonifizierung der Nematoden (3 x 10 Zyklen, 50 %) und zehnminütiger Zentrifugation (4 °C, 12000 x g) wurde der Überstand abgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt, wobei das Gewicht der eingesetzten Proteinmenge ermittelt wurde.

2.2.2.14 Bestimmung der Zitratsynthaseaktivität

Die vorbehandelten Nematoden wurden nach entsprechender Inkubation (siehe 2.2.2.3) mit kaltem S-Puffer geerntet (siehe 2.2.2.4). Anschließend wurden sie mit 300 μ l Probenpuffer (100 mM MOPS pH 8,2, 100 mM Bicin pH 8,2, 3 mM EDTA) im flüssigen Stickstoff gemörsert. Nach zehnminütiger Zentrifugation (12000 x g, 4 °C) wurde der Überstand entnommen und auf eine Proteinkonzentration von 0,75 μ g/ μ l eingestellt (Bradford, siehe

2.2.2.25). Der Assay basierte auf dem Protokoll von Jeffery [Jeffery *et al.* 1984, Srere *et al.* 1963] und wurde im 96-Wellformat durchgeführt. Der Ansatz enthielt MOPS (110 mM pH 8,2), Bicin (110 mM pH 8,2), Acetyl CoA (0,2 mM), DTNB (0,1 mM) und 10 µl Probe. Durch die Zugabe von Oxalacetat (0,2 mM) wurde die Reaktion gestartet.

Die Zitratsynthase katalysiert die Kondensation des Oxalacetats mit Acetyl-CoA zum Zitrat. Das freiwerdende Coenzym A bildet mit DTNB einen photometrisch detektierbaren Farbkomplex bei 412 nm (Abbildung 9).



Abbildung 9: Reaktionen bei der Bestimmung der Zitratsynthaseaktivität.

2.2.2.15 Bestimmung der Katalase- und Superoxiddismutaseaktivität

Nach den entsprechenden Inkubationen (siehe 2.2.2.3) wurden die Wurmpellets (Dreifachbestimmung) geerntet (siehe 2.2.2.4) und bei -80 °C eingefroren. Danach wurden diese Pellets unter ständiger Kühlung mittels flüssigen Stickstoffs und 200 µl S-Puffer gemörsernt, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 200 µl S-Puffer beschichtet. Nach dem Auftauen der Proben wurden sie sonifiziert (3 x 10 Zyklen, 50 %) und zentrifugiert (12000 x g, 10 min 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues Reagiergefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels Bradford bestimmt (siehe 2.2.2.25).

Zur Bestimmung der Katalaseaktivität wurde 1 µg/µl und für die SOD Aktivität 0,1 µg/µl Wurmprotein eingesetzt. Die Katalaseaktivität wurde analog des „Catalase Assay Kits“ von Calbiochem (Kat.-Nr. 219265) ermittelt. Diese Methode basiert auf der Reaktion des Enzyms mit Methanol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid. Das entstehende Formaldehyd kann durch Zugabe von Purpald (chromogen) photometrisch bei 540 nm gemessen werden.

Die Messung der Superoxiddismutaseaktivität erfolgte entsprechend der Anleitung im SOD Kit von Sigma-Aldrich (Kat.-Nr. 19160). Die Reduktion von Sauerstoff steht dabei in linearer Korrelation zur Aktivität der Xanthinoxidase und wird durch die Superoxiddismutase inhibiert. Die WST-1 Lösung wird durch ein Superoxidanion zu einem Formazanfarbstoff reduziert (Abbildung 10). Diese Absorptionsveränderung ist somit proportional zur Menge an Superoxidanionen. Folglich kann die SOD Aktivität als inhibierende Aktivität bei einer Absorption bei 440 nm quantitativ gemessen werden.

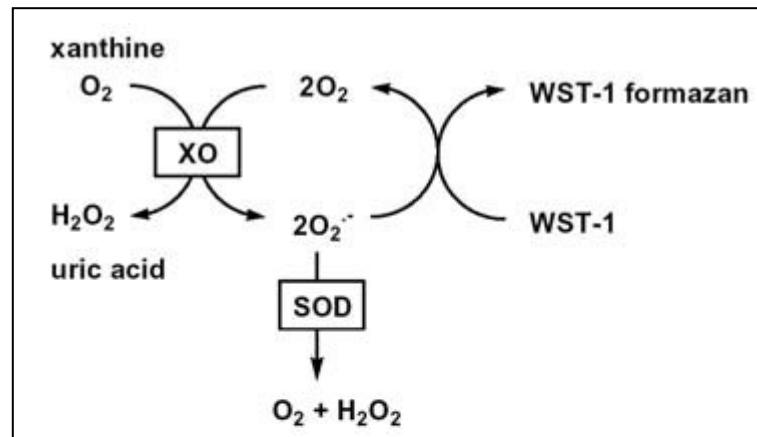


Abbildung 10: Prinzip der Messung der SOD-Aktivität.

2.2.2.16 Messung der Komplex-1-Aktivität in der Atmungskette

Die Messung der Komplex-1-Aktivität erfolgte nach Janssen [Janssen *et al.* 2007] mit den dort aufgeführten Substratkonzentrationen. Dazu wurden Mitochondrien aus Mausleber isoliert, welche vom Institut für Versuchstierkunde und Tierschutz in Jena zur Verfügung gestellt wurde.

Es wurde zunächst die Inkubationslösung bestehend aus Kaliumphosphatpuffer, DCIP, Decylubiquinon sowie Antimycin A vorbereitet und in die Wells (je 960 μ l) einer 24-Wellplatte vorgelegt. Danach folgte die Zugabe von 20 μ l Mausmitochondrien in die Wells (je Behandlung 4 Wells), wobei vier Wells als Negativkontrolle nicht mit Mitochondrien versehen wurden. Nach dreiminütiger Vorinkubation wurden 20 μ l NADH je Well hinzugefügt, die Platte kurz geschüttelt und die Absorption bei 600 nm im 30-Sekunden-Intervall für vier Minuten bei 20 °C gemessen. Anschließend wurde Ritalin (Endkonzentration 50 μ M) bzw. Rotenon (Endkonzentration 1 μ M) dazugegeben und erneut die Absorption für zehn Minuten im 30-Sekunden-Intervall bei 20 °C ermittelt. Da Rotenon ein Komplex-1-Hemmer ist [Sherer *et al.* 2003], wurde es als Positivkontrolle verwendet.

Nach der Oxidation von NADH durch den Komplex-1 wurden die freiwerdenden Elektronen über das Decylubiquinon auf das DCIP (2,6-Dichloroindophenol) übertragen. Diese Reduktion des DCIP konnte folglich photometrisch bei 600 nm gemessen werden. Zur Auswertung wurde der lineare Anstieg vor und nach der Zugabe von Ritalin bzw. Rotenon berechnet und das Verhältnis relativ zur unbehandelten Kontrolle gesetzt.

Durch andere NADH Dehydrogenasen entstehende Elektronen können nicht vom Decylubiquinon aufgenommen werden, somit war die Reduktion des DCIP nur durch die Aktivität des Komplex-1 möglich [Fischer *et al.* 1986].

2.2.2.17 Bestimmung des Fettgehaltes

Nach entsprechender Inkubationszeit (siehe 2.2.2.3) wurden die Würmer geerntet (siehe 2.2.2.4) und mit eisgekühlten MQ™ Wasser mit 5 % Triton X-100 unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Nach der Überführung in ein Reaktionsgefäß wurden die Proben sonifiziert (3 x 10 Zyklen, 50 %). Ein Teil wurde für die Proteinbestimmung verwendet und der Rest auf 80 °C erwärmt und geschüttelt, um die Triglyceride in Lösung zu bringen. Durch die fünfminütige Zentrifugation bei 6000 x g wurde das unlösliche Material abgetrennt. Die Proben und die Triglycerid-Standards (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 µg/µl) wurden auf eine 96-Wellplatte aufgetragen und nach der Zugabe einer gebrauchsfertigen Reagenz von Roche (ROCHE TG Triglyceride GPO-PAP; 12016648) für 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt.

Die im Kit enthaltene Lipoproteinlipase hydrolysiert Triglyceride zu Glycerin mit anschließender Oxidation zu Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid. Das entstehende Wasserstoffperoxid bildet unter der katalytischen Wirkung der Peroxidase mit 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol in einer Endpunktreaktion einen roten Farbstoff. Die Farbintensität des gebildeten roten Farbstoffs ist direkt proportional zur Triglyceridkonzentration und konnte photometrisch bei 540 nm gemessen werden.

Anschließend wurden die Werte auf das Protein normalisiert, welche zuvor mittels der BCA-Methode (siehe 2.2.2.25) bestimmt wurden.

2.2.2.18 Quantifizierung der Pumprate

Zur Bestimmung der Pumprate von *C. elegans* wurde die Mikroskopkamera ProgRes® CT1 der Firma JenOptik und die zugehörige Software ProgRes® CapturePro verwendet. Für eine gute Auswertung der Pumpbewegungen waren folgende Einstellungen vorzunehmen:

- 20-fache, optische Vergrößerung
- Aufnahmezeit: 20 Sekunden
- Aufnahme von 20 Bildern pro Sekunde
- Auflösung: 640 x 480 Pixel
- Bildformat: bmp, 8 bpp

Aufgrund der hohen Fortbewegungsgeschwindigkeit von $0,05\text{-}0,2\text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ [Swierczek *et al.* 2011] von *C. elegans*, war es notwendig die Würmer zwischen zwei Agarosepads zu fixieren. Den zu untersuchenden Würmern wurden während der Fixierung $4\text{ }\mu\text{l}$ einer 20-fach konzentrierten und hitzeinaktivierten Bakteriensuspension als Nahrungsquelle angeboten. Zur Wiedergabe der, durch die Kamerasoftware erstellten, Videoaufnahmen wurde der Microsoft® Windows Media Player verwendet. Bei einem Viertel der Geschwindigkeit wurden die deutlich sichtbaren Pharynxbewegungen wiedergegeben, gezählt und pro 60 Sekunden ausgewertet. Dabei bildete eine vollständige Bewegung des Pharynx nach vorn und wieder zurück in die Ausgangsstellung eine komplette, abgeschlossene Pharynxkontraktion.

2.2.2.19 Quantifizierung der Nahrungsaufnahme

Zur Bestimmung der Nahrungsaufnahme von *C. elegans* wurden L4 -Würmer für zwei Tage mit der entsprechenden Substanz und dem Lösungsmittel als Dreifachbestimmung inkubiert (siehe 2.2.2.3). Anschließend wurden diese für fünf Stunden auf Agarplatten gesetzt, welche zuvor mit $500\text{ }\mu\text{l}$ OP50 HIT angeimpft wurden. Als Referenz wurden mit der gleichen Bakterienmenge beimpfte Agarplatten ohne Würmer mitgeführt. Nach den fünf Stunden wurden die Bakterien, Würmer und Eier mittels S-Puffer und einem gebogenen Glasspatel abgekratzt. Es folgte eine einminütige Zentrifugation ($200 \times g$), bei welcher die Bakterien von den Würmern abgetrennt wurden. Der Überstand wurde in ein neues 15 ml-Röhrchen überführt und die Würmer erneut gewaschen. Auch dieser Überstand wurde in ein neues Röhrchen gegeben. Diese beiden Reagiergefäße wurden anschließend bei $1300 \times g$ zentrifugiert, sodass ebenfalls die Eier abgetrennt wurden. Beide Überstände wurden in ein 50 ml-Röhrchen zusammengegeben, welches mit S-Puffer auf 30 ml aufgefüllt wurde. Anschließend folgte die Messung der optischen Dichte bei 600 nm am Photometer.

Anschließend wurden die Nematoden sonifiziert (3×10 Zyklen, 50 %). Nach zehnminütiger Zentrifugation ($12000 \times g$, 10 min $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurde der Überstand in ein neues Reagiergefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels Bradford bestimmt (siehe 2.2.2.25). Die Differenz von der optischen Dichte der Bakteriensuspension der Referenzplatten und der abgefressenen Inkubationsplatte wurden bestimmt. Diese wurde mit der Proteinkonzentration ins Verhältnis gesetzt. Man erhielt die Menge der gefressenen Bakterien bezogen auf das Protein.

Als Positivkontrolle wurde die Nahrungsaufnahme von *eat-2* Mutanten quantifiziert, welche eine verminderte Pharynx-Pumpfrequenz und somit über eine eingeschränkte Nahrungsaufnahme verfügten [Raizen *et al.* 1995].

2.2.2.20 Messung der Beweglichkeit

Um die motorische Aktivität von *C. elegans* bestimmen zu können, war es nötig mittels einer Kamera am Mikroskop ein Video eines einzelnen Wurms aufzunehmen. Dazu wurde das Programm Motic Images Plus 2.0 verwendet. Nach zehntägiger Inkubation mit bzw. ohne Ritalin (siehe 2.2.2.3) wurden einzelne Würmer von der Platte gepickt und in S-Puffer mit 0,01 % Triton X abgesetzt. Nachdem sie auf den Boden abgesunken waren, wurden sie mit einem Pipettiervolumen von 1 µl auf einen Objektträger pipettiert. Die Oberflächenspannung sollte dabei so maximal wie möglich sein, um ein Herausschwimmen des Wurmes zu vermeiden. Es wurden je Behandlung zehn Nematoden für exakt 20 Sekunden gefilmt. Es war wichtig, dass die Bilderzahl des Videos nur minimal schwankte. Nur so konnte eine Vergleichbarkeit erzielt und die Standardabweichung gering gehalten werden. Der Film wurde anschließend mit der Software Danio Track, welche ursprünglich für die Analyse der Bewegung von Zebrafischen *Danio rerio* verwendet wurde, analysiert. Nachdem der Hintergrund herausgerechnet wurde und die Pixel ins Verhältnis zu einem Millimeter gesetzt wurden, erkannte das Programm das Objekt Wurm. Die Analyse startete und die zurückgelegte Distanz wurde errechnet.

2.2.2.21 Western Blot

Die geernteten Wurm pellets (siehe 2.2.2.4) wurden mit 200 µl des Inhibition Cocktails unter Stickstoffkühlung gemörsert, danach sonifiziert (3 x 10 Zyklen, 50 %) und zentrifugiert (12000 x g, 10 min, 4 °C). Der Probenüberstand wurde in ein neues Eppendorf Gefäß überführt, wobei ein Aliquot zur Proteinbestimmung (Bradford, siehe 2.2.2.25) abgenommen wurde. Es folgte eine 3:1 Verdünnung mit Laemmli (Zusatz: 15 % β-Mercaptoethanol) und eine sofortige Denaturierung für fünf Minuten bei 95 °C. Für die Elektrophorese wurden 30 µg Probe pro Tasche eingesetzt.

Zunächst wurde das Trenngel in den Gelstand gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Aushärtung wurde das Isopropanol abgegossen und das Trenngel mit

Sammelgel überschichtet. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde es aus dem Gelstand entnommen und für die Elektrophorese in die Laufkammer gesetzt. Die Kämme wurden entfernt und die Laufkammer mit Laufpuffer aufgefüllt. Es folgte das Auftragen des Markers und der Proben. Die Elektrophorese lief bei 100 V für eineinhalb bis zwei Stunden. Danach wurde das Gel mit destilliertem Wasser abgespült und das Sammelgel entfernt. Es folgte eine 30-minütige Voräquilibration im Kathodenpuffer.

Für den Blot musste der Anodenpuffer I und II sowie der Kathodenpuffer auf Raumtemperatur gebracht werden. Die entsprechende Anzahl an Filterpapieren wurde daraufhin für 30 Minuten darin eingeweicht. Die Membran wurde kurz in Methanol benetzt und anschließend ebenfalls für 30 Minuten in den Anodenpuffer II gelegt. Danach erfolgte der Aufbau des Blotsandwichs aus den entsprechend eingeweichten Filterpapieren nach folgendem Schema (von unten beginnend):

- 4x Anodenpuffer I
- 2x Anodenpuffer II
- Membran
- Gel
- 6x Kathodenpuffer

Der Blot lief bei 25 V für 1 Gel 30 Minuten beziehungsweise eine Stunde für zwei Gele. Nach dem Blotten wurde die Membran vorsichtig entnommen, ein bis zwei Minuten in Ponceau-Rot gefärbt und anschließend fotografiert. Es folgte das Blockieren für ein bis zwei Stunden in TBST mit fünfprozentigem Magermilchpulver. Nach dem Waschen in TBST wurde der erste Antikörper (AK) in fünfprozentiger BSA-Lösung zugegeben und über Nacht im Kühlschrank auf dem Wippschüttler inkubiert. Der zweite AK wurde, nach erneutem Waschen der Membran, in fünfprozentigem Magermilchpulver zugegeben. Die Membran wurde anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Entwicklung erfolgte mit Hilfe einer Chemolumineszenzlösung in der Dunkelkammer.

2.2.2.22 Laserablation von ASI-Neuronen

Die Laserablation der ASI-Neuronen wurde am Fritz-Lipmann-Institut (Jena) mit der Hilfe von Dr. Shamci Monajembashi durchgeführt. Für diese fokussierte Laserablation wurde der Laserstrahl eines UV-gepulsten Lasers (diodengepumptes, Q-geschaltetes Dreifach-Frequenz-Lasersystem: Triton; TEM00, 349 nm; max. Leistung 1 W; Wiederholungsrate: 1 Hz-1000 Hz; Pulslänge: < 15 ns; Pulskraft: von 1 bis 200 µJ justierbar; Spectra Physics,

Darmstadt, Deutschland) durch ein Teleskop erweitert und mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510) durch Epifluoreszenzstrahlung gekoppelt. Der Laserstrahl wurde auf die Objektebene durch ein Zeiss Plan-Neofluar Objektiv (100/1.3 Ölobjektiv; Punktdurchmesser <500 nm) fokussiert, nachdem es durch einen dielektrischen Spiegel (Laser Optik, Deutschland) reflektiert wurde. Der dielektrische Spiegel wurde auf der Leerlaser-Scanning-Position des Fluoreszenzreflektors platziert, übertrug sowohl den Laserstrahl als auch die emittierte Fluoreszenz und reflektierte den gepulsten Tritonlaser. So wurde die Bildqualität des Lasermikroskops nicht beeinträchtigt. Bevor der Laserstrahl mit dem Mikroskop verbunden wurde, wurde die Pulsenergie durch einen Regler (Laser Optik) auf 80 % reduziert. Die Laserablation der ASI-Neuronen in *C. elegans* wurde nach Bishop [Bishop und Guarente 2007b] durchgeführt. L4-Nematoden, welche GFP (grün-fluoreszierendes Protein) von einem ASI-spezifischen str-3 Promotor exprimieren (*ky/s[*str-3::gfp*]*; CX3596), wurden kurz mit 4 M Tetramisol für ca. fünf Minuten paralytisiert und anschließend mit einigen Laserpulsen bestrahlt (Laserenergie: 4 µJ). Die Zellschädigung wurde erfasst und durch die Zeitreihen-Funktion eines Laser-Scanning-Mikroskops (Zeiss) kontrolliert. Dieses LSM war mit einem Argonstrahl, Emissionsfiltersätzen und der Zeiss LSM Software 3.2 zur Detektion der EGFP Signale ausgestattet. Die Nematoden wurden sofort nach der Ablation auf Agarplatten transferiert und die Analyse der Lebensspanne erfolgte wie unter 2.2.2.5 beschrieben.

2.2.2.23 DNA-Isolation

Zur DNA-Isolierung wurden die geernteten Pellets (siehe 2.2.2.4) unter flüssigen Stickstoff gemörsert und mit je 400 µl Lysepuffer versetzt. Die Proben wurden bei 55 °C über Nacht inkubiert und anschließend mit 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt und gevortext. Nach der Zentrifugation (10000 x g, 10 min, RT) wurde die wässrige Phase vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nochmals mit 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Als kein Protein mehr in der Interphase zu erkennen war, erfolgte die Zugabe von 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Die Proben wurden gevortext und erneut zentrifugiert. Die obere klare Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1/8 des Volumens an Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und das zweifache Volumen an 100-prozentigem Ethanol dazu gegeben. Die Fällung der DNA erfolgte über Nacht bei -20 °C oder für zwei Stunden bei -80 °C. Nachdem die Proben bei maximaler Geschwindigkeit für 20 Minuten zentrifugiert wurden, wurde der Überstand

verworfen und das Pellet mit 1 ml 70-prozentigem Ethanol zweimal gewaschen. Die isolierte DNA wurde an der Luft getrocknet, in 20 µl TE-Puffer (55 °C) gelöst und bei 4 °C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle erfolgte mithilfe des NanoDrops 2000.

2.2.2.24 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Quantifizierung der mitochondrialen (mtDNA) und genomischen DNA(gDNA) erfolgte mittels Real-Time PCR. Die isolierte und gelöste DNA wurde in einer Konzentration von 10 ng/µl eingesetzt. Folgender Reaktionsansatz und Reaktionsverlauf wurde angewendet:

Tabelle 5: Reaktionsansatz und Reaktionsverlauf der Real-Time PCR

Reaktionsansatz pro Well	Substanz	Volumen	
	Power SYBR Green PCR Master Mix	2 µl	
	DNA	1 µl	
	Senseprimer	0,35 µl	
	Antisenseprimer	0,35 µl	
	ddH ₂ O	1,4 µl	
Reaktionsverlauf	Temperatur	Zeit	Zyklen
	95 °C (initiale Denaturierung)	10 min	} 40
	95 °C (Denaturierung)	15 s	
	60 °C (Annealing; Elongation)	1 min	
	4 °C		

Zur Quantifizierung der mtDNA und der gDNA wurden folgende Primersets (Invitrogen; Endkonzentration je 10 µM) verwendet:

- mtDNA: [Sumitani *et al.* 2011]
forward 5'-CTTTTATTACTCTATATGAGCGTC-3' (whole genome *C. elegans* fw)
reverse 5'-AACAAAAGAAATTCCTGGTACAAG-3' (whole genome *C. elegans* rev)
- gDNA: (designed mit Primer Express)
forward 5'-GCGAAAGCATTTGCCAAGAA-3' (cE18S-1_UP)
reverse 5'-ATCGCGAGATGGCATCGTT-3' (cE18S-1_LO)

Die relative Quantifizierung der mtDNA erfolgte über den Bezug zur genomische DNA (gDNA). Der relative Expressionsunterschied ergibt sich aus dem folgenden arithmetischen Berechnungsmodell [Higuchi *et al.* 1993, Manczak *et al.* 2004]: $RC = 2^{-\Delta\Delta CT}$, wobei RC der relativen Kopienanzahl und CT dem *threshold cycle* entspricht.

In den ersten Zyklen wurde anhand der Hintergrundfluoreszenz ein Schwellenwert (*threshold*) berechnet. Als das Fluoreszenzsignal diesen Schwellenwert überschritten hatte, wurde dieser Zeitpunkt (Zyklus) als *threshold cycle* (CT) des entsprechenden Reaktionsansatzes definiert. Durch Auswertung der in der exponentiellen Amplifikationsphase gemessenen CT-Werte ließ sich die Startkopienzahl der untersuchten DNA-Sequenz quantifizieren. Je mehr DNA am Beginn der Reaktion vorhanden war, desto niedriger war der zu erwartende CT-Wert.

2.2.2.25 Proteinbestimmung

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung für die meisten Experimente erfolgte mittels des Bradford-Tests [Bradford 1976]. Das Prinzip dieses Assays basiert auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Blau G 250 an saure und kationische Reste von Proteinen in saurer Lösung. Die rote ungebundene Form des Farbstoffes weist ein Absorptionsmaximum von 465 nm auf, welches sich nach der Komplexbildung auf 595 nm verschiebt.

Der Test wurde in einer 96-Wellplatte durchgeführt. Eine Standardreihe (0, 0,5, 1, 2, 3, 4 µg/µl Bovines Serum Albumin) wurde bei jeder Messung mitgeführt. Entsprechend des pipettierten Volumens wurde Lösungsmittel oder Puffer der Probe als Hintergrund zu den Standards gegeben. Nach Zugabe von 250 µl der Bradford-Lösung wurde die Lösung auf einen Schüttler zwei Minuten durchmischt und bei 595 nm im Photometer bemessen.

Durch die Zunahme der Absorption bei 595 nm konnte ein Rückschluss auf die Proteinkonzentration in der Lösung gezogen werden.

Proteinbestimmung mittels BCA-Test

Das Prinzip des BCA-Tests beruht auf der Reaktion von zweiwertigen Kupferionen mit Proteinen zu einwertigen Kupferionen, die in Verbindung mit der Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbstoff bilden, dessen Absorption photometrisch bestimmt werden kann.

Proben und Standards (0; 2; 5; 10; 20; 30; 40 µg/µl) wurden auf eine 96-Wellplatte aufgetragen und anschließend mit 100 µl BCA-Reagenz versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Absorption bei 560 nm gemessen.

2.2.2.26 Statistik

In den Diagrammen wurden jeweils die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) dargestellt. Mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests erfolgte die Prüfung auf Normalverteilung. Zur Bestimmung der Irrtumswahrscheinlichkeit wurde der T-Tests für unabhängige Stichproben in Excel (Microsoft® Office Version 2007) angewendet. Das Signifikanzniveau wurde wie folgt festgelegt:

* $p \leq 0,05$

** $p \leq 0,01$

*** $p \leq 0,001$

Zur statistischen Analyse der Lebensspanne und Stressresistenz wurde der Log-Rang-Test mithilfe der JMP Software 9.0 durchgeführt.

Die Diagramme und Überlebenskurven wurden mit dem Programm Graph Pad Prism 9 erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Glucosamin

3.1.1 Auswirkung von GlcN auf die Lebenserwartung

Bei der Analyse der Lebensspanne zeigten GlcN-behandelte Nematoden eine signifikante Verlängerung der Lebenserwartung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 11). Dieses Experiment wurde mehrfach wiederholt und es ergab sich eine durchschnittliche mittlere Lebensverlängerung um 5,7 % und eine durchschnittliche Verlängerung der maximalen Lebensspanne um 5,4 % (siehe Tabelle 8).

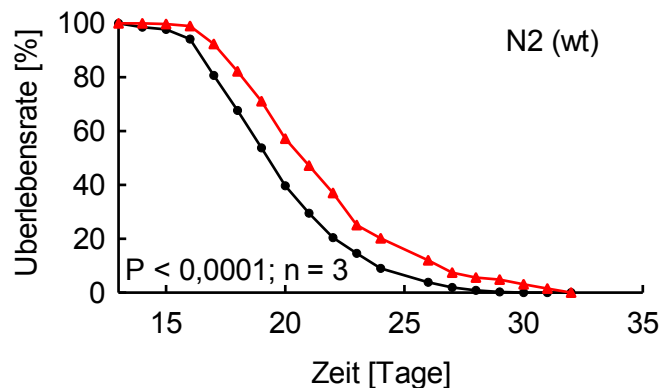


Abbildung 11: Effekt von GlcN auf die Lebenserwartung.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von Wildtyp-Nematoden (N2) in An- und Abwesenheit von GlcN (exemplarisches Beispiel). Es zeigte sich eine Lebensverlängerung infolge einer GlcN-Behandlung ($P < 0,0001$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; rot: 100 µM GlcN; weitere Informationen in Tabelle 8.

Glucosamin wurde für die weiteren Experimente in einer Konzentration von 100 µM eingesetzt, da eine niedrigere Konzentration von 10 µM eine geringere Lebensverlängerung nach sich zog (Abbildung 12) und durch 1000 µM GlcN der lebensverlängernde Effekt nicht verstärkt werden konnte (Abbildung 12).

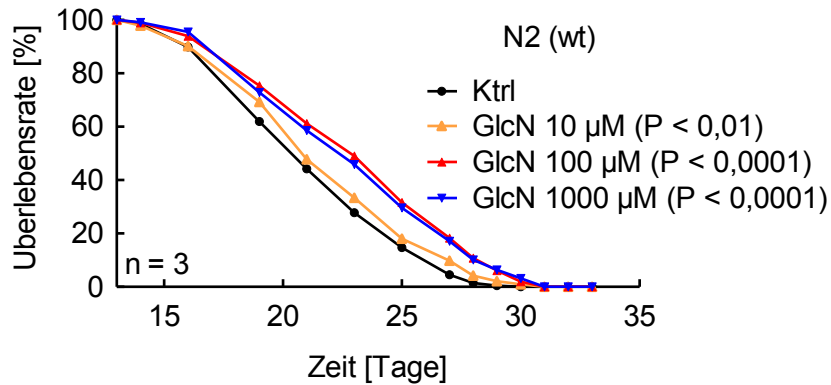


Abbildung 12: Effekt von GlcN (10 µM; 100 µM; 1000 µM) auf die Lebenserwartung.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von Wildtyp-Nematoden (N2) in An- und Abwesenheit von 10 µM, 100 µM und 1000 µM GlcN. Es zeigte sich eine Lebensverlängerung nach einer GlcN-Behandlung mit 10 µM ($P < 0,01$). Dieser Effekt wurde durch eine Konzentration von 100 µM GlcN verstärkt ($P < 0,0001$). Eine Inkubation mit 1000 µM GlcN konnte die Lebensverlängerung von 100 µM GlcN nicht weiter steigern. Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; orange: 10 µM GlcN; rot: 100 µM GlcN; blau: 1000 µM GlcN; weitere Informationen in Tabelle 8.

3.1.2 Einfluss von GlcN auf die Nahrungsaufnahme

Zur Bestimmung der Nahrungsaufnahme wurde die Aufnahme der *E. coli* Bakterien mithilfe der optischen Dichte gemessen. Es ergab sich kein Unterschied in der Nahrungszufuhr zwischen den Kontrollwürmern und den GlcN-behandelten Nematoden (Abbildung 13). Als Positivkontrolle wurde die *eat-2* Mutante genutzt, welche eine stark verminderte Pharynxpumpfrequenz besitzt und somit durch eine deutlich verringerte Nahrungsaufnahme gekennzeichnet ist [Raizen *et al.* 1995], die hier auch bestätigt werden konnte (Abbildung 13).

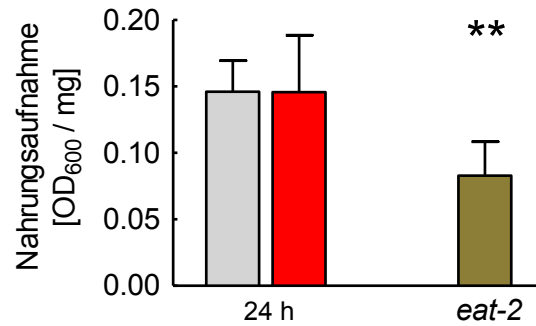


Abbildung 13: Effekt von GlcN auf die Nahrungsaufnahme.

Abgebildet ist die *E. coli*-Aufnahme von Wildtyp-Nematoden nach 24-stündiger Inkubation mit bzw. ohne GlcN und von unbehandelten *eat-2*-Mutanten. Es zeigte sich keine Beeinflussung der Nahrungsaufnahme durch 100 µM GlcN ($P = 0,99$). Die Nahrungszufuhr wurde bei den *eat-2* Mutanten stark verringert ($P = 0,0014$). Dargestellt ist der MW \pm STABW; $n = 3$; grau: Kontrolle; rot: 100 µM GlcN; braun: *eat-2* Mutanten (24 h).

3.1.3 Wirkung von GlcN auf den Glukosestoffwechsel

Zunächst wurde der Effekt von GlcN auf die Glukoseaufnahme in *C. elegans* untersucht. Hierbei zeigten Nematoden nach einer dreistündigen GlcN-Inkubation eine signifikant erniedrigte Glukoseaufnahme im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abbildung 14). Cytochalasin B konnte als Positivkontrolle bestätigt werden, da die Nematoden infolge einer einstündigen Inkubation mit dem Glukosetransporthemmer eine um 42 % reduzierte Glukoseaufnahme aufwiesen (Abbildung 14).

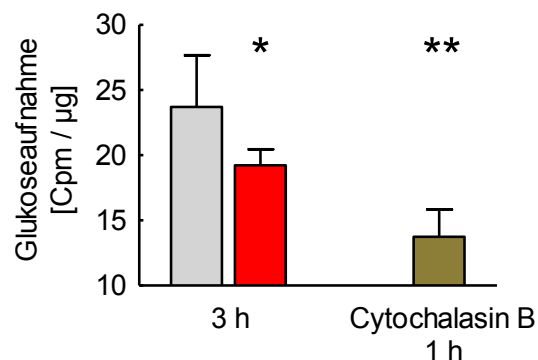


Abbildung 14: Effekt von GlcN auf die Glukoseaufnahme.

Abgebildet ist die Glukoseaufnahme nach dreistündiger Inkubation mit bzw. ohne GlcN und einstündiger Inkubation mit Cytochalasin B. Es zeigte sich eine Reduktion der Glukoseaufnahme durch eine Behandlung mit GlcN ($P = 0,04$) und Cytochalasin B ($P = 0,001$). Dargestellt ist der MW \pm STABW; $n = 5$; grau: Kontrolle; rot: 100 µM GlcN; braun: 10 µM Cytochalasin B.

Weiterhin wurde der Einfluss von GlcN auf die Glukoseoxidation analysiert. Eine 24-stündige Inkubation mit GlcN hatte eine deutliche Reduktion (um 43 %) der Glukoseoxidation im Vergleich zur Kontrollgruppe zur Folge (Abbildung 15).

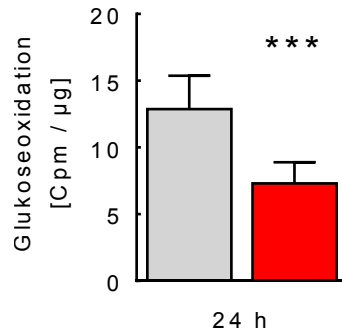


Abbildung 15: Effekt von GlcN auf die Glukoseoxidation.

Abgebildet ist die Glukoseoxidation nach eintägiger Inkubation mit bzw. ohne GlcN. Es zeigte sich eine Reduktion der Glukoseoxidation infolge einer GlcN-Behandlung. Dargestellt ist der MW \pm STABW; n = 6; P = 0,0009; grau: Kontrolle; rot: 100 µM GlcN.

3.1.4 Effekte von GlcN auf die Energiebilanz

Die durch GlcN verursachten Störungen im Glukosemetabolismus nach eintägiger Inkubation, lassen eine Reduktion in der Gesamtenergie vermuten. Daher wurde der ATP-Gehalt in den Nematoden bestimmt. Es wurde ein signifikanter ATP-Abfall nach eintägiger Inkubation mit GlcN im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet (Abbildung 16). Nach zwei bzw. sieben Tagen GlcN-Behandlung war der ATP-Spiegel in beiden Gruppen wieder ausgeglichen (Abbildung 16).

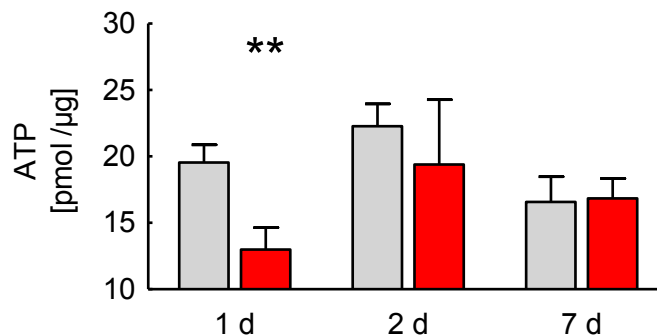


Abbildung 16: Effekt von GlcN auf den ATP-Gehalt.

Abgebildet sind die ATP-Spiegel nach ein-, zwei- und siebentägiger Inkubation mit bzw. ohne GlcN. Es zeigte sich eine Senkung des ATP-Gehaltes nach eintägiger GlcN-Inkubation (P = 0,007). Dargestellt ist der MW \pm STABW; n = 3; grau: Kontrolle; rot: 100 µM GlcN.

Außerdem wurde mittels Western Blot der Einfluss von GlcN auf die Phosphorylierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK; AAK-2 Ortholog in *C. elegans*) untersucht. Nach einer eintägigen Inkubation mit GlcN war eine verstärkte Aktivierung der AMPK/AAK-2 nachweisbar (Abbildung 17). Die AAK-2 defiziente Mutante zeigte, wie erwartet, kein Signal bei der Detektion der phosphorylierten AMPK (Abbildung 17).

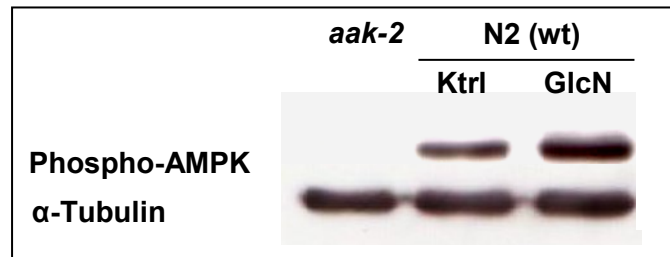


Abbildung 17: Effekt von GlcN auf die Aktivierung der AMPK/AAK-2.

Abgebildet sind die Western Blots von Lysaten aus unbehandelten und GlcN- (100 μ M, 24 h) behandelten Wildtyp-Nematoden sowie aus unbehandelten AAK-2 defizienten Nematoden. Es zeigte sich eine verstärkte Phosphorylierung der AMPK/AAK-2 nach GlcN-Inkubation. Die AAK-2 defiziente Mutante zeigte kein Phospho-AMPK/AAK-2-Signal.

Anschließend erfolgte eine Analyse der Lebensspanne mit AAK-2 Knockout-Mutanten in An- und Abwesenheit von GlcN. In der Abbildung 18 wird deutlich, dass der lebensverlängernde Effekt von GlcN in den Wildtyp-Nematoden nun in den AAK-2 defizienten Mutanten aufgehoben wurde.

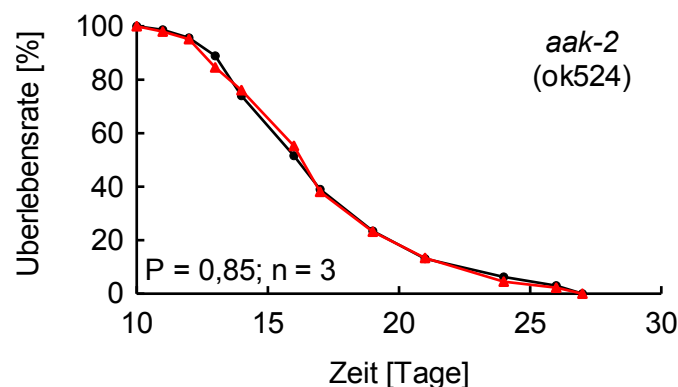


Abbildung 18: Effekt von GlcN auf die Lebenserwartung von *aak-2* Mutanten.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von AAK-2 defizienten Nematoden in An- und Abwesenheit von GlcN. Es zeigte sich keine Lebensverlängerung infolge einer GlcN-Behandlung ($P = 0,85$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; rot: 100 μ M GlcN; weitere Informationen in Tabelle 8.

Weiterhin wurde der Einfluss von Sirtuinen auf die GlcN-vermittelte Lebensverlängerung untersucht und eine Lebensspannenanalyse mit SIR2.1 defizienten Nematoden durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass mit GlcN behandelte Nematoden weiterhin signifikant länger lebten (Abbildung 19).

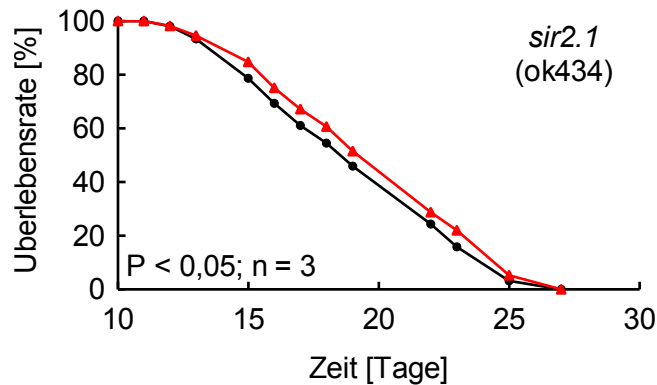


Abbildung 19: Effekt von GlcN auf die Lebenserwartung von *sir2.1* Mutanten.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von SIR2.1 defizienten Nematoden in An- und Abwesenheit von GlcN. Es zeigte sich eine Lebensverlängerung infolge einer GlcN-Behandlung ($P = 0,047$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; rot: 100 μM GlcN; weitere Informationen in Tabelle 8.

3.1.5 Wirkung von GlcN auf den Mitochondrienstoffwechsel

Zunächst wurde die Aktivität der Zitratsynthase bestimmt, welche als quantitativer Marker für den Gehalt an intakten Mitochondrien genutzt wird. Es konnte eine signifikante Erhöhung der Zitratsynthaseaktivität infolge einer siebentägigen GlcN-Behandlung gemessen werden (Abbildung 20).

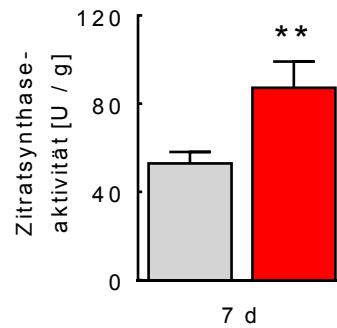


Abbildung 20: Effekt von GlcN auf die Zitratsynthaseaktivität.

Abgebildet ist die Zitratsynthaseaktivität nach siebentägiger Inkubation mit bzw. ohne GlcN. Es zeigte sich eine erhöhte Aktivität der Zitratsynthase infolge der GlcN-Behandlung ($P = 0,002$). Dargestellt ist der $MW \pm STABW$; $n = 3$; grau: Kontrolle; rot: 100 µM GlcN.

Weiterhin wurde das Verhältnis mitochondrialer DNA (mtDNA) zu genomischer DNA (gDNA) mittels Real-Time PCR bestimmt. Hierbei konnte eine verstärkte Expressionsrate der mitochondrialen Gene infolge einer siebentägigen GlcN-Behandlung festgestellt werden (Abbildung 21).

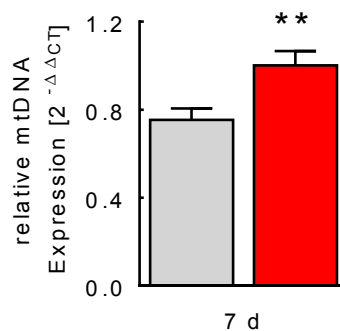


Abbildung 21: Effekt von GlcN auf die Expression mitochondrialer Gene.

Abgebildet sind die Ergebnisse einer Real-Time PCR. Es zeigte sich eine verstärkte Expression der mtDNA infolge einer GlcN-Behandlung ($P = 0,007$; Referenz war die Expressionsrate der gDNA). Dargestellt ist der $MW \pm STABW$ der RC-Werte nach der $\Delta\Delta CT$ -Methode; $n = 3$; grau: Kontrolle; rot: 100 µM GlcN.

Mitochondrien sind der Ort der Atmungskettenphosphorylierung. Daher wurde der Sauerstoffverbrauch mithilfe der Clark-Elektrode bestimmt. Nach eintägiger Inkubation mit GlcN zeigte sich eine tendenziell erhöhte Respiration im Vergleich zur Kontrollgruppe ($P = 0,08$; Abbildung 22). Infolge einer zweitägigen GlcN-Behandlung konnte ein signifikant erhöhter Sauerstoffverbrauch (Abbildung 22) bestimmt werden, welcher nach siebentägiger Inkubation wieder ausgeglichen war (Abbildung 22).

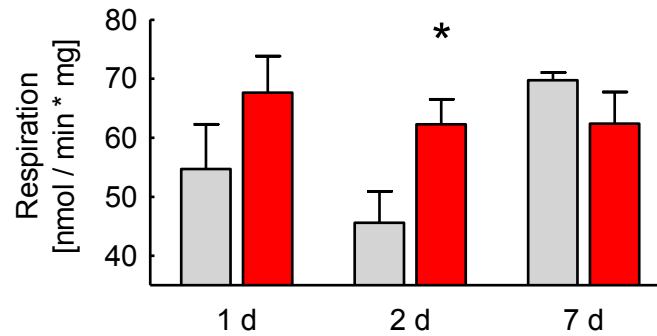


Abbildung 22: Effekt von GlcN auf die Respiration.

Abgebildet sind die Respirationsraten nach ein-, zwei- und siebentägiger Inkubation mit bzw. ohne GlcN. Es zeigte sich ein erhöhter Sauerstoffverbrauch nach zweitägiger GlcN-Behandlung ($P = 0,01$). Dargestellt ist der MW \pm STABW; $n = 3$; grau: Kontrolle; rot: 100 μ M GlcN.

Eine verstärkte Atmung hat bekanntermaßen einen erhöhten Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zur Folge [Nohl *et al.* 2003]. Daher wurde die mitochondriale ROS-Produktion (mtROS) mithilfe des ROS-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes (Mitotracker Red CM-H2X) gemessen. Nach eintägiger GlcN-Behandlung konnte kein Unterschied in der mtROS-Produktion beobachtet werden (Abbildung 23). Allerdings konnte nach zweitägiger Behandlung mit GlcN ein signifikanter Anstieg und nach siebentägiger GlcN-Inkubation ein signifikanter Abfall der reaktiven Sauerstoffspezies in den Mitochondrien festgestellt werden (Abbildung 23). Die Behandlung mit dem ROS-induzierenden Rotenon (Rot) wurde hier als Positivkontrolle genutzt und bestätigt (Abbildung 23).

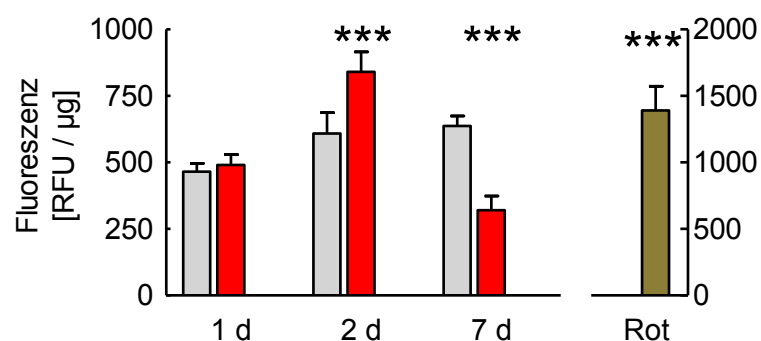


Abbildung 23: Effekt von GlcN auf die mitochondriale ROS-Produktion.

Abgebildet sind die mitochondrialen ROS-Spiegel nach ein-, zwei- und siebentägiger Inkubation mit bzw. ohne GlcN. Es zeigten sich erhöhte mtROS-Level nach zweitägiger GlcN-Behandlung ($P < 0,0001$) sowie nach einer Rotenon-Inkubation ($P < 0,000001$) und eine Senkung der mtROS-Produktion nach siebentägiger GlcN-Behandlung ($P < 0,00001$). Dargestellt ist der MW \pm STABW; $n = 3$; grau: Kontrolle; rot: 100 μ M GlcN; braun: 1 μ M Rotenon (Rot).

Weiterhin erfolgte die quantitative Bestimmung des Wasserstoffperoxids (H_2O_2) mittels Amplex Red Fluoreszenz. Dabei konnte nach zweitägiger Behandlung mit GlcN ein signifikanter Anstieg des Wasserstoffperoxidgehaltes (Abbildung 24) und nach siebentägiger GlcN-Inkubation ein signifikanter Abfall der H_2O_2 -Produktion gemessen werden (Abbildung 24).

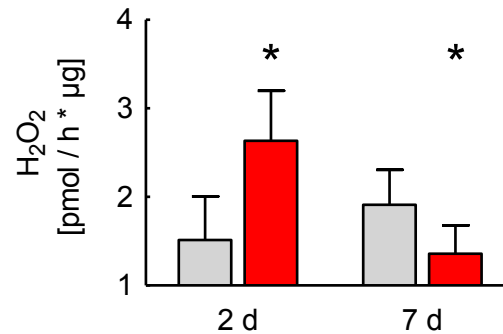


Abbildung 24: Effekt von GlcN auf die Wasserstoffperoxidproduktion.

Abgebildet ist der H_2O_2 -Gehalt nach zwei- und siebentägiger Inkubation mit bzw. ohne GlcN. Es zeigte sich eine erhöhte H_2O_2 -Produktion nach zweitägiger GlcN-Behandlung ($P = 0,01$) und ein Abfall des H_2O_2 -Gehaltes nach siebentägiger GlcN-Inkubation ($P = 0,04$). Dargestellt ist der $\text{MW} \pm \text{STABW}$; $n = 5$; grau: Kontrolle; rot: $100 \mu\text{M}$ GlcN.

3.1.6 Effekte von GlcN auf die Aktivität antioxidativer Enzyme

Die veränderten ROS Spiegel lassen eine Aktivitätsänderung antioxidativer Enzyme vermuten. Daher wurden die Aktivitäten der Superoxiddismutase (SOD) und der Katalase in An- und Abwesenheit von GlcN zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Es wurden keine Veränderungen nach ein- bzw. zweitägiger GlcN-Behandlung in der SOD- (Abbildung 25) und in der Katalase-Aktivität (Abbildung 26) beobachtet. Aber eine längere GlcN-Inkubation von sieben Tagen erhöhte signifikant sowohl die SOD- als auch die Katalase-Aktivität in den Nematoden (Abbildung 25 und Abbildung 26).

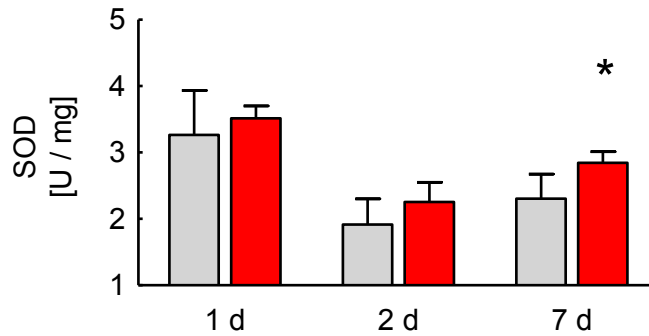


Abbildung 25: Effekt von GlcN auf die SOD-Aktivität.

Abgebildet sind die Aktivitäten der SOD nach ein-, zwei- und siebentägiger Inkubation mit bzw. ohne GlcN, wobei sich eine erhöhte SOD-Aktivität nach siebentägiger GlcN-Behandlung zeigte ($P = 0,04$). Dargestellt ist der MW \pm STABW; $n = 3$; grau: Kontrolle; rot: 100 μ M GlcN.

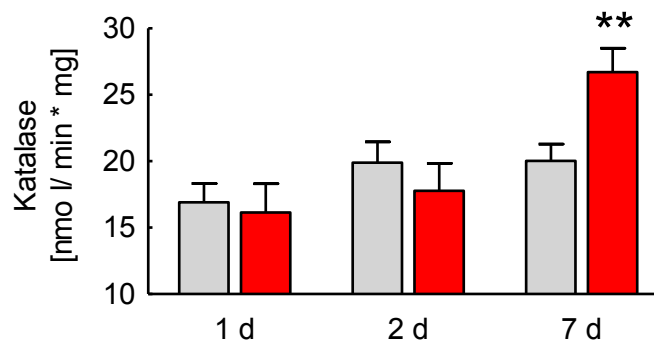


Abbildung 26: Effekt von GlcN auf die Katalase Aktivität.

Abgebildet sind die Aktivitäten der Katalase nach ein-, zwei- und siebentägiger Inkubation mit bzw. ohne GlcN, wobei sich eine erhöhte Katalase-Aktivität nach siebentägiger GlcN-Behandlung zeigte ($P = 0,006$). Dargestellt ist der MW \pm STABW; $n = 3$; grau: Kontrolle; rot: 100 μ M GlcN.

3.1.7 Auswirkung von GlcN auf die Stressresistenz

Zunächst wurde der Einfluss von GlcN auf die Stressresistenz gegenüber Paraquat, einem ROS-Induzierer, getestet. Nach einer sechstägigen Vorinkubation mit bzw. ohne GlcN wurden die Nematoden auf Paraquatplatten gesetzt, um die Überlebensrate zu bestimmen. Es konnte eine signifikant erhöhte oxidative Stressresistenz der GlcN-vorbehandelten Nematoden im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abbildung 27).

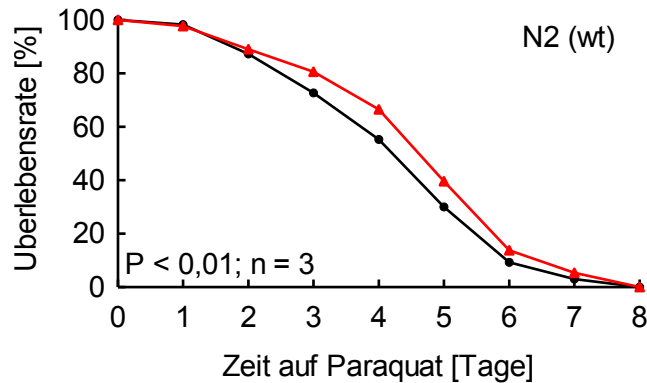


Abbildung 27: Effekt von GlcN auf die Paraquat-Stressresistenz.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von Wildtyp-Nematoden (N2) in Anwesenheit von 10 mM Paraquat nach sechstägiger Vorinkubation mit bzw. ohne GlcN. Es zeigte sich eine erhöhte oxidative Stressresistenz infolge der GlcN-Vorinkubation ($P = 0,007$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; rot: 100 µM GlcN.

Ein weiteres Experiment zur Analyse der Stressresistenz war die Untersuchung der Paralyse. Dazu wurde der Stamm CL4176 [*smg-1(cc546)* I; *dvIs27* X] verwendet, der ein *myo-3/Aβ* Transgen besitzt, welches durch eine Temperaturerhöhung exprimiert wird und zur Paralyse führt. Das Ergebnis zeigte deutlich, dass mit GlcN-behandelte Nematoden signifikant weniger paralytisierten als die unbehandelte Gruppe (Abbildung 28). Durch die Inkubation mit Coffein (Positivkontrolle) konnte eine noch stärker verminderte Paralyse der Nematoden festgestellt werden (Abbildung 28).

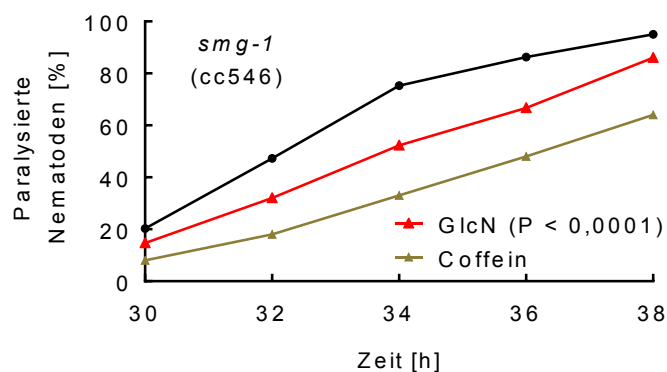


Abbildung 28: Effekt von GlcN auf die Paralyse.

Abgebildet sind die Paralysekurven der *smg-1(cc546)* Mutanten in An- und Abwesenheit von GlcN bzw. Coffein, wobei sich eine reduzierte Paralyse der Nematoden infolge der GlcN- und Coffein-Behandlung zeigte. Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ (\pm GlcN); $n = 1$ (Coffein) Experimenten; schwarz: Kontrolle; rot: 100 µM GlcN; braun: 3,6 mM Coffein.

3.1.8 Effekt von GlcN auf die Lebensspanne in Gegenwart von Antioxidantien

Zur Prüfung der Essentialität des ROS-Anstiegs bei der GlcN-vermittelten Lebensverlängerung wurden Lebenszeitanalysen von Nematoden durchgeführt, die sowohl mit GlcN als auch gleichzeitig mit den Antioxidantien NAC (N-Acetyl-Cystein) und BHA (Butylhydroxyanisol) inkubiert wurden. Durch eine alleinige Behandlung der Antioxidantien wurde kein Einfluss auf die Lebenserwartung beobachtet (Abbildung 29 und Abbildung 30).

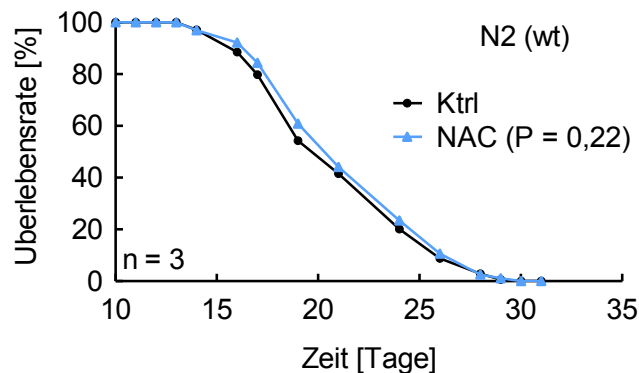


Abbildung 29: Effekt von NAC auf die Lebenserwartung.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von Wildtyp-Nematoden (N2) in An- und Abwesenheit von NAC (N-Acetyl-Cystein). Es zeigte sich keine Lebensverlängerung infolge einer NAC-Behandlung ($P = 0,22$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; blau: 1 mM NAC; weitere Informationen in Tabelle 8.

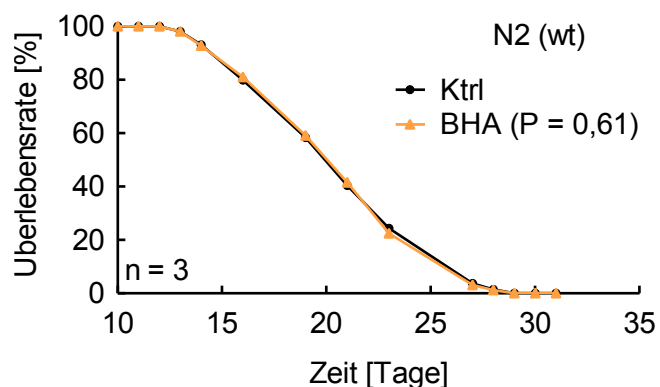


Abbildung 30: Effekt von BHA auf die Lebenserwartung.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von Wildtyp-Nematoden (N2) in An- und Abwesenheit von BHA (Butylhydroxyanisol). Es zeigte sich keine Lebensverlängerung infolge einer BHA-Behandlung ($P = 0,61$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; orange: 10 μ M BHA; $P = 0,61$; weitere Informationen in Tabelle 8.

Weiterhin wurde die Lebenserwartung von Nematoden untersucht, welche sowohl mit GlcN als auch gleichzeitig mit NAC bzw. BHA inkubiert wurden. Der Aminosucker GlcN verlängerte, wie zuvor schon gezeigt, die Lebensspanne von *C. elegans* ($P < 0,0001$; Abbildung 31 und Abbildung 32). Allerdings wurde dieser lebensverlängernde Effekt durch die zeitgleiche Gabe von NAC bzw. BHA komplett aufgehoben (Abbildung 31 und Abbildung 32).

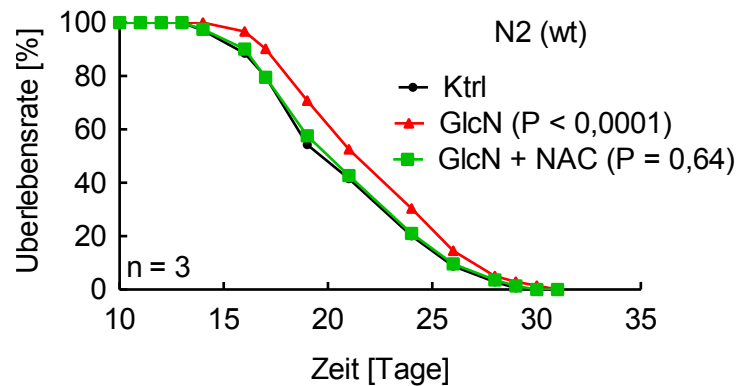


Abbildung 31: Effekt von GlcN auf die Lebenserwartung in Anwesenheit von NAC.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von Wildtyp-Nematoden (N2) in An- und Abwesenheit von GlcN und NAC (N-Acetyl-Cystein). Es zeigte sich eine Aufhebung der GlcN-vermittelten Lebensverlängerung durch eine gleichzeitige Inkubation von GlcN und NAC ($P = 0,64$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; rot: 100 μM GlcN; grün: 100 μM GlcN + 1 mM NAC; weitere Informationen in Tabelle 8.

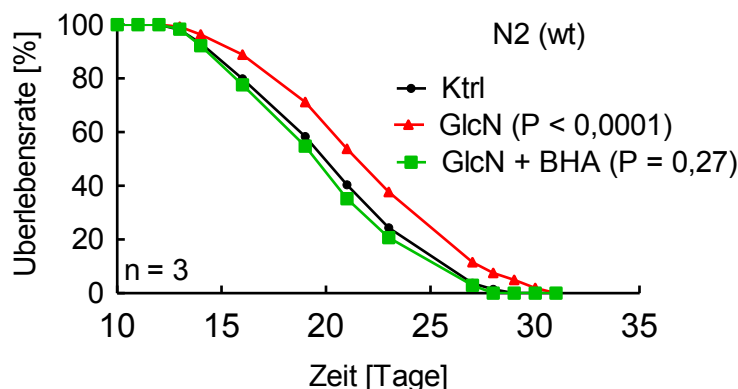


Abbildung 32: Effekt von GlcN auf die Lebenserwartung in Anwesenheit von BHA.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von Wildtyp-Nematoden (N2) in An- und Abwesenheit von GlcN und BHA (Butylhydroxyanisol). Es zeigte sich eine Aufhebung der GlcN-vermittelten Lebensverlängerung durch eine gleichzeitige Inkubation von GlcN und BHA ($P = 0,27$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; rot: 100 μM GlcN; grün: 100 μM GlcN + 10 μM BHA; weitere Informationen in Tabelle 8.

3.1.9 Wirkung von GlcN auf ROS-Sensoren

Um die Übermittlung des GlcN-induzierten ROS-Signals zu analysieren, wurde zunächst die Aktivierung der p38 MAP-Kinase untersucht. Mittels Western Blot konnte eine verstärkte Phosphorylierung der p38 MAPK (*C. elegans* Ortholog: PMK-1) nach einer zweitägigen GlcN-Behandlung festgestellt werden (Abbildung 33). Die PMK-1 defiziente Mutante zeigte, wie erwartet, kein Signal bei der Detektion von Phospho-p38 MAPK/PMK-1 (Abbildung 33).

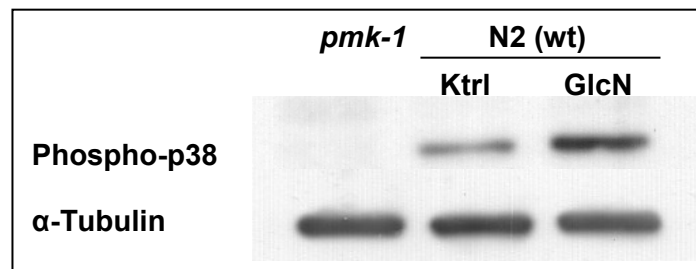


Abbildung 33: Effekt von GlcN auf die Aktivierung der p38 MAPK/PMK-1.

Abgebildet sind die Western Blots von Lysaten aus unbehandelten und GlcN- (100 μ M, 48 h) behandelten Wildtyp-Nematoden sowie aus unbehandelten PMK-1 defizienten Nematoden. Es zeigte sich eine verstärkte Phosphorylierung der p38 MAPK/PMK-1 nach GlcN-Inkubation. Die PMK-1 defiziente Mutante zeigte kein Phospho-p38 MAPK/PMK-1 Signal.

Anschließend wurde untersucht, ob p38 MAPK/PMK-1 bei der GlcN-vermittelten Lebensverlängerung mit involviert ist. Daher folgte eine Analyse der Lebensspanne mit PMK-1 defizienten Mutanten in An- und Abwesenheit von GlcN. Hierbei zeigte sich, dass der lebensverlängernde Effekt einer GlcN-Inkubation in den Wildtyp-Nematoden nun in diesen PMK-1 defizienten Nematoden nicht mehr beobachtet werden konnte (Abbildung 34).

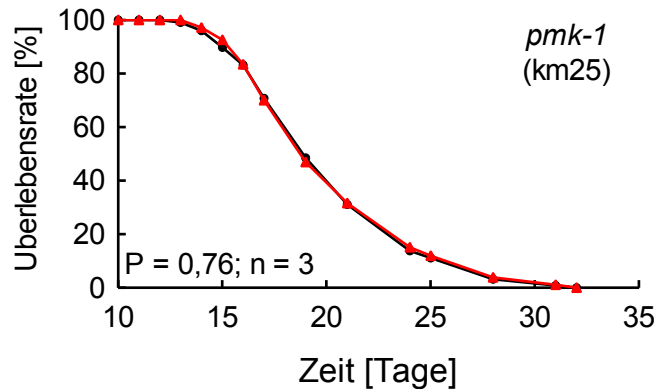


Abbildung 34: Effekt von GlcN auf die Lebenserwartung von *pmk-1* Mutanten.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von PMK-1 defizienten Nematoden in An- und Abwesenheit von 100 µM GlcN. Es zeigte sich keine Lebensverlängerung infolge einer GlcN-Behandlung ($P = 0,76$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; rot: 100 µM GlcN; weitere Informationen in Tabelle 8.

Weiterhin kann oxidativer Stress den Transkriptionsfaktor SKN-1 (mammalisches Ortholog: NRF2) aktivieren [Inoue *et al.* 2005]. Deshalb wurde untersucht, ob die Lebensverlängerung durch GlcN auch von SKN-1 abhängig ist. Bei der Analyse der Lebensspanne von SKN-1 defizienten Mutanten (zu135, globaler Knockout) lebten GlcN-behandelten Nematoden nicht länger, tendenziell sogar kürzer, als die Kontrollgruppe ohne GlcN-Exposition (Abbildung 35).

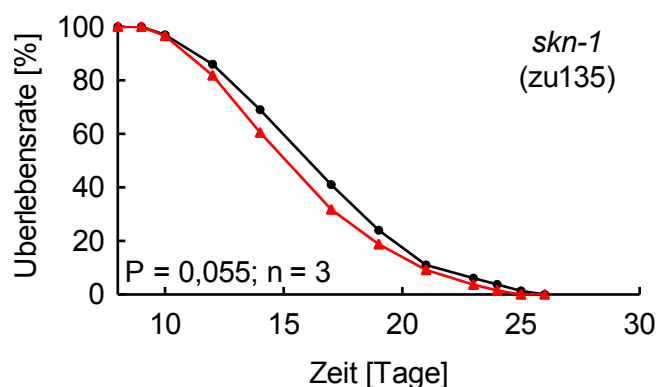


Abbildung 35: Effekt von GlcN auf die Lebenserwartung von *skn-1* Mutanten.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von SKN-1 defizienten Nematoden (zu135, globaler Knockout) in An- und Abwesenheit von 100 µM GlcN. Es zeigte sich keine Lebensverlängerung infolge einer GlcN-Behandlung ($P = 0,055$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; rot: 100 µM GlcN; weitere Informationen in Tabelle 8.

Außerdem wurde der Einfluss von DAF-16, ein Transkriptionsfaktor der Forkhead-Familie (FOXO) auf die GlcN-verursachte Lebensverlängerung analysiert. Hierbei zeigte sich, dass DAF-16 defiziente Nematoden durch eine GlcN-Behandlung signifikant länger lebten, wenngleich der lebensverlängernde Effekt von GlcN in den Wildtyp-Nematoden verringert wurde (Abbildung 36).

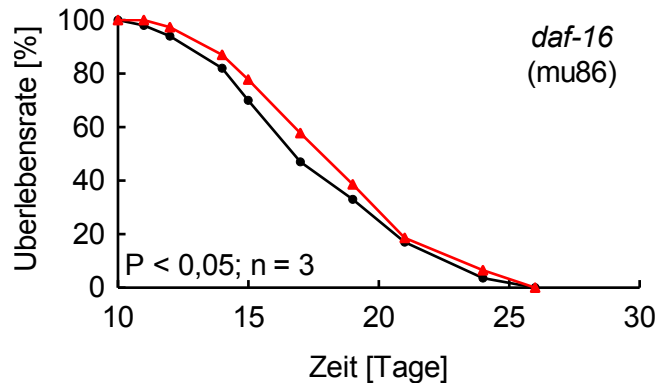


Abbildung 36: Effekt von GlcN auf die Lebenserwartung von *daf-16* Mutanten.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von DAF-16 defizienten Nematoden in An- und Abwesenheit von 100 µM GlcN. Es zeigte sich eine Lebensverlängerung infolge einer GlcN-Behandlung ($P = 0,015$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; rot: 100 µM GlcN; weitere Informationen in Tabelle 8.

3.2 Ritalin

3.2.1 Auswirkung von Ritalin auf die Lebenserwartung

Die Analyse der Lebensspanne zeigte eine signifikante Verlängerung der Lebenserwartung durch eine Inkubation mit Ritalin in Wildtyp-Nematoden (Abbildung 37). Dabei ergab sich eine durchschnittliche mittlere Lebensverlängerung um 4,4 % und eine durchschnittliche Verlängerung der maximalen Lebensspanne um 6,5 % (siehe Tabelle 9).

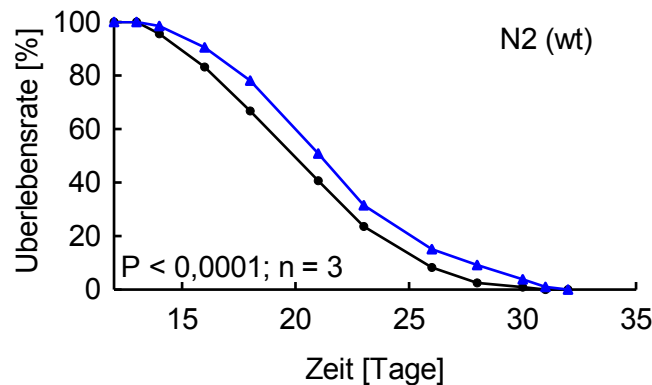


Abbildung 37: Effekt von Ritalin auf die Lebenserwartung.

Abgebildet sind die Überlebenskurven (exemplarisches Beispiel) von Wildtyp-Nematoden (N2) in An- und Abwesenheit von Ritalin. Es zeigte sich eine Lebensverlängerung infolge einer Ritalin-Inkubation ($P < 0,0001$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; blau: 5 µM Ritalin; weitere Informationen in Tabelle 9.

3.2.2 Einfluss von Ritalin auf die Beweglichkeit

Um die Wirkung von Ritalin auf die motorische Aktivität der Fadenwürmer zu untersuchen, wurde die in einer Sekunde zurückgelegte Strecke von Ritalin-inkubierten und unbehandelten Nematoden mithilfe der Software Danio Track errechnet. Dabei konnte eine zehntägige Ritalin-Exposition die Beweglichkeit von *C. elegans* signifikant erhöhen (Abbildung 38).

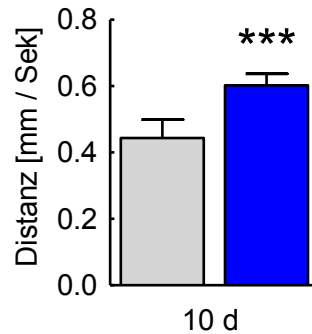


Abbildung 38: Effekt von Ritalin auf die Beweglichkeit.

Abgebildet ist die pro Sekunde zurückgelegte Strecke der Wildtyp-Nematoden nach zehntägiger Inkubation mit bzw. ohne Ritalin. Es zeigte sich eine erhöhte motorische Aktivität durch die Ritalin-Behandlung ($P = 0,0006$). Dargestellt ist der MW \pm STABW; $n = 3$; grau: Kontrolle; blau: 5 μ M Ritalin.

3.2.3 Wirkung von Ritalin auf die Komplex-1-Aktivität der Atmungskette

Einige Studien zeigten, dass Ritalin den Komplex-1 der Atmungskette hemmen kann [Fagundes *et al.* 2010b]. Daher wurde die Komplex-1-Aktivität von Mausmitochondrien in An- und Abwesenheit von Ritalin gemessen. Allerdings wurde durch eine Ritalin-Konzentration von 50 μ M (10-Faches der in *C. elegans* eingesetzten Ritalindosis) keine Hemmung der Komplex-1-Aktivität hervorgerufen (Abbildung 39). Rotenon wurde hierbei als Positivkontrolle eingesetzt und bestätigt (Abbildung 39).

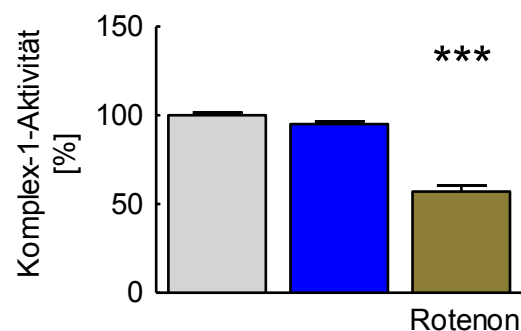


Abbildung 39: Effekt von Ritalin auf die Komplex-1-Aktivität.

Abgebildet ist die Komplex-1-Aktivität von Mausmitochondrien in An- und Abwesenheit von Ritalin und Rotenon. Es zeigte sich keine Beeinflussung der Aktivität durch Ritalin und eine Hemmung des Komplex-1 durch die Zugabe von Rotenon ($P < 0,0001$). Dargestellt ist der MW \pm STABW; $n = 4$; grau: Kontrolle; blau: 50 μ M Ritalin; braun: 1 μ M Rotenon.

3.2.4 Einfluss von Ritalin auf die Nahrungsaufnahme

Die Wirkung von Ritalin auf die Nahrungsaufnahme der Nematoden wurde zunächst anhand der Pharynxkontraktionen bestimmt. Nach zweitägiger Behandlung mit Ritalin konnte eine deutlich geringere Pharynxkontraktion beobachtet werden (Abbildung 40), welche nach fünftägiger Ritalin-Inkubation war dieser Effekt immer noch signifikant (Abbildung 40).

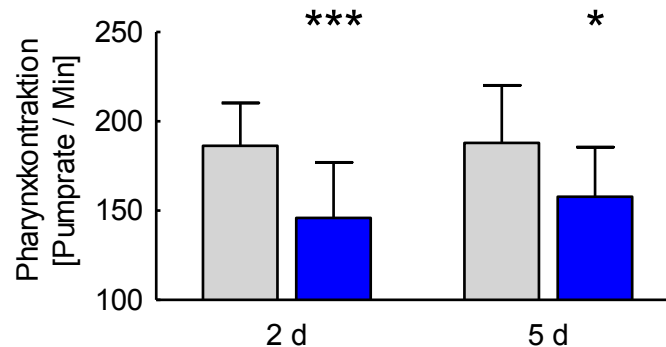


Abbildung 40: Effekt von Ritalin auf die Pharynxkontraktion.

Abgebildet ist die Pharynx-Pumprate nach zwei- und fünftägiger Inkubation mit bzw. ohne Ritalin. Es zeigte sich eine verringerte Pharynxkontraktion infolge der zweitägigen ($P = 0,0003$) und fünftägigen ($P = 0,03$) Ritalin-Behandlung. Dargestellt ist der MW \pm STABW; $n = 3$; grau: Kontrolle; blau: 5 μ M Ritalin.

Weiterhin wurde die *E. coli* Aufnahme gemessen, um die Menge der aufgenommenen Nahrung quantitativ zu bestimmen. Nematoden mit einer zweitägigen Ritalin-Inkubation wiesen eine 50-%ige Reduktion der Nahrungsaufnahme im Vergleich zur unbehandelten Gruppe auf (Abbildung 41). Selbst nach fünftägiger Ritalin-Behandlung konnte eine signifikante Verringerung der Nahrungsaufnahme festgestellt werden, wenngleich der Effekt leicht abgeschwächt wurde (Abbildung 41). Als Positivkontrolle wurde die *eat-2* Mutante genutzt, welche infolge einer verringerten Pharynxkontraktion durch eine stark reduzierte Nahrungsaufnahme gekennzeichnet ist [Raizen *et al.* 1995] (Abbildung 41).

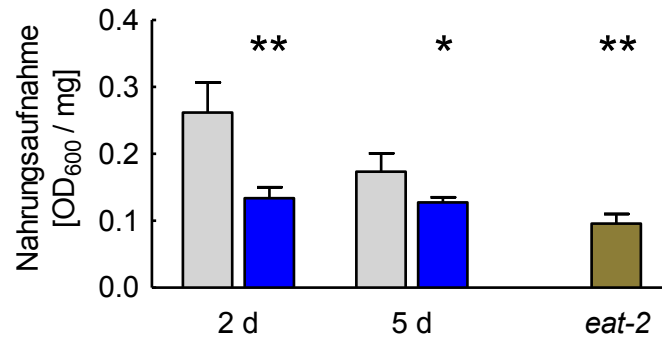


Abbildung 41: Effekt von Ritalin auf die Nahrungsaufnahme.

Abgebildet ist die *E. coli*-Aufnahme nach zwei-, fünf- und siebentägiger Inkubation mit bzw. ohne Ritalin. Es zeigte sich eine Reduktion der Nahrungszufuhr nach zweitägiger ($P = 0,009$) und fünftägiger ($P = 0,04$) Ritalin-Behandlung sowie in den *eat-2* Mutanten ($P = 0,005$). Dargestellt ist der $MW \pm STABW$; $n = 3$; grau: Kontrolle; blau: 5 μM Ritalin; grün: *eat-2* Mutanten (24 h).

3.2.5 Effekte von Ritalin auf die Energiebilanz

Es wurde die Wirkung von Ritalin auf den ATP-Gehalt nach verschiedenen Zeitpunkten getestet. Dabei zeigte sich ein signifikanter ATP-Abfall nach zweitägiger Ritalin-Behandlung (Abbildung 42). Nach dreitägiger Inkubation mit Ritalin war der ATP-Spiegel noch tendenziell geringer als in der Kontrollgruppe ($P = 0,064$) und nach fünftägiger Ritalin-Behandlung konnte kein Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden (Abbildung 42).

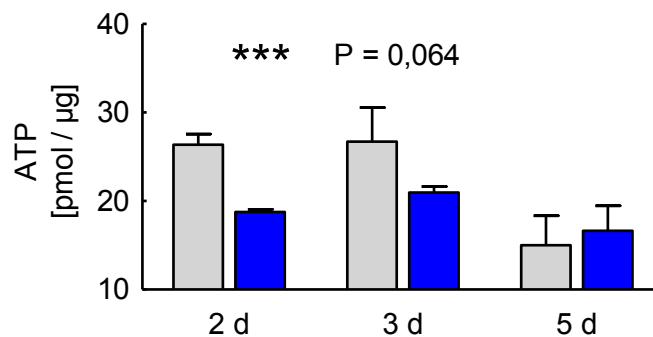


Abbildung 42: Effekt von Ritalin auf den ATP-Gehalt.

Abgebildet ist der ATP-Gehalt nach zwei-, drei- und fünftägiger Inkubation mit bzw. ohne Ritalin. Es wurde eine Senkung des ATP-Spiegels nach zweitägiger Ritalin-Inkubation beobachtet ($P = 0,0004$). Dargestellt ist der $MW \pm STABW$; $n = 3$; grau: Kontrolle; blau: 5 μM Ritalin.

Weiterhin wurde der Einfluss von Ritalin auf die Aktivierung der AMPK (AAK-2 in *C. elegans*) mittels Western Blot untersucht. Nach einer zweitägigen Inkubation mit Ritalin war eine verstärkte Phosphorylierung der AMPK/AAK-2 nachweisbar (Abbildung 43). Die AAK-2 defiziente Mutante zeigte kein Signal bei der Detektion der phosphorylierten AMPK/AAK-2 (Abbildung 43).

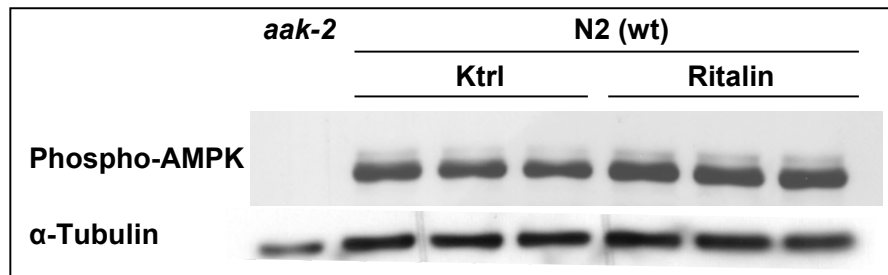


Abbildung 43: Effekt von Ritalin auf die Aktivierung der AMPK/AAK-2.

Abgebildet sind die Western Blots von Wurmlysaten aus unbehandelten und Ritalin- (5 μ M, 48 h) behandelten Wildtyp-Nematoden sowie aus unbehandelten AAK-2 defizienten Nematoden. Es zeigte sich eine verstärkte Phosphorylierung der AMPK/AAK-2 nach einer Ritalin-Inkubation. Die AAK-2 defiziente Mutante zeigte kein Phospho-AMPK/AAK-2-Signal.

Anschließend folgte eine Lebensspannenanalyse von AAK-2 defizienten Mutanten in An- und Abwesenheit von Ritalin. Die Abbildung 44 zeigt deutlich, dass der lebensverlängernde Effekt von Ritalin in den Wildtyp-Nematoden in den AAK-2 defizienten Mutanten aufgehoben wurde.

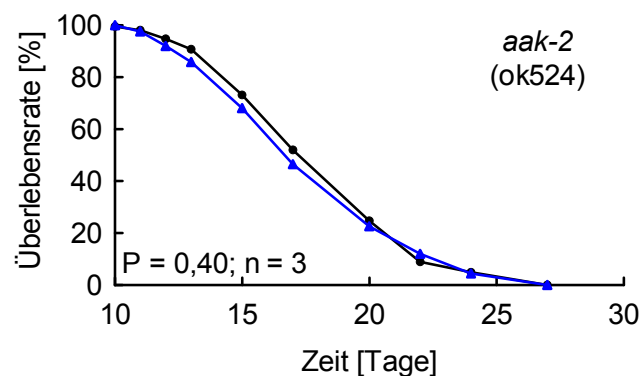


Abbildung 44: Effekt von Ritalin auf die Lebenserwartung von *aak-2* Mutanten.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von AAK-2 defizienten Nematoden in An- und Abwesenheit von Ritalin. Es zeigte sich keine Lebensverlängerung infolge einer Ritalin-Inkubation ($P = 0,4$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; blau: 5 μ M Ritalin; weitere Informationen in Tabelle 9.

3.2.6 Einfluss von Ritalin auf den Fettgehalt

Eine zweitägige Inkubation mit Ritalin hatte eine tendenzielle Reduktion ($P = 0,08$) des Triglyceridgehaltes in den Nematoden zur Folge (Abbildung 45). Nach drei- und fünftägiger Ritalin-Behandlung konnte aber eine signifikante Verringerung des Fettgehaltes im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abbildung 45).

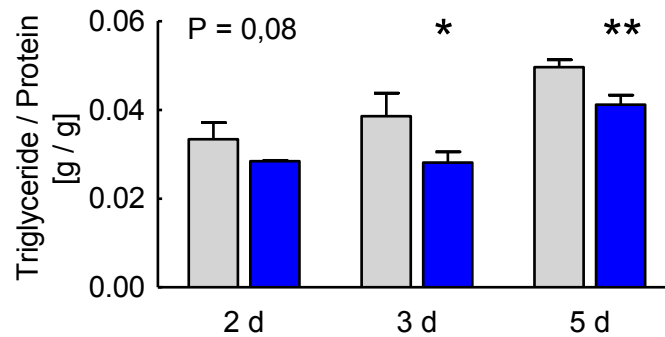


Abbildung 45: Effekt von Ritalin auf den Fettgehalt.

Abgebildet ist der Triglyceridgehalt nach zwei-, drei- und fünftägiger Inkubation mit bzw. ohne 5 µM Ritalin. Es zeigte sich eine Reduktion des Fettgehaltes nach dreitägiger ($P = 0,03$) und fünftägiger ($P = 0,005$) Ritalin-Behandlung. Dargestellt ist der MW \pm STABW; $n = 3$; grau: Kontrolle; blau: 5 µM Ritalin.

3.2.7 Wirkung von Ritalin auf den Mitochondrienstoffwechsel

Zunächst wurde die Aktivität der Zitratsynthase in den Mitochondrien bestimmt. Es konnte eine signifikant erhöhte Zitratsynthaseaktivität sowohl nach zwei- als auch nach dreitägiger und fünftägiger Ritalin-Behandlung festgestellt werden (Abbildung 46).

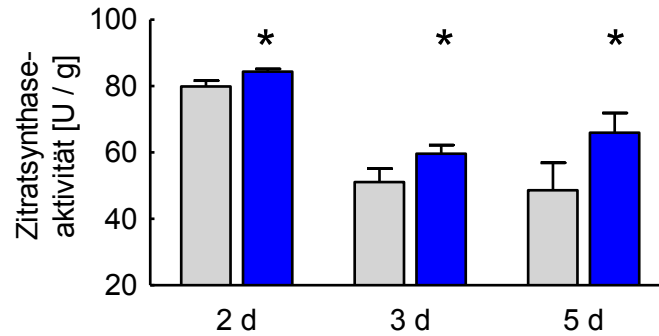


Abbildung 46: Effekt von Ritalin auf die Zitratsynthaseaktivität.

Abgebildet ist die Zitratsynthaseaktivität nach zwei-, drei- und fünftägiger Inkubation mit bzw. ohne Ritalin. Es zeigte sich eine erhöhte Aktivierung der Zitratsynthase nach zweitägiger ($P = 0,01$), dreitägiger ($P = 0,03$) und fünftägiger ($P = 0,04$) Ritalin-Behandlung. Dargestellt ist der $MW \pm STABW$; $n = 3$; grau: Kontrolle; blau: 5 μM Ritalin.

Des Weiteren wurde die Wirkung von Ritalin auf den Sauerstoffverbrauch untersucht. Hierbei ergaben sich signifikant erhöhte Respirationsraten nach zwei- und dreitägiger Inkubation der Nematoden mit Ritalin (Abbildung 47). Infolge einer fünftägigen Ritalin-Behandlung konnte kein Unterschied in der Respiration beider Gruppen festgestellt werden (Abbildung 47).

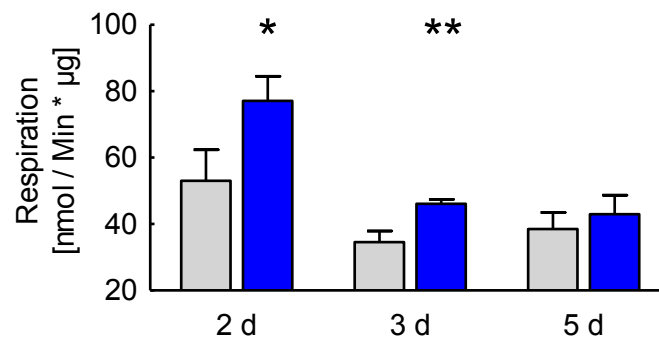


Abbildung 47: Effekt von Ritalin auf die Respiration.

Abgebildet sind die Respirationsraten nach zwei-, drei- und fünftägiger Inkubation mit bzw. ohne Ritalin. Es zeigte sich ein erhöhter Sauerstoffverbrauch nach zweitägiger ($P = 0,02$) und dreitägiger ($P = 0,005$) Ritalin-Behandlung. Dargestellt ist der $MW \pm STABW$; $n = 3$; grau: Kontrolle; blau: 5 μM Ritalin.

Aufgrund des Respirationsanstiegs wurden die ROS-Spiegel in den Nematoden bestimmt. Mithilfe des Mitotracker Fluoreszenzfarbstoffes wurde ein signifikanter Anstieg der mitochondrialen ROS-Produktion (mtROS) nach zwei- und dreitägiger Ritalin-Behandlung

beobachtet (Abbildung 48). Durch eine fünftägige Ritalin-Inkubation konnte hingegen ein deutlicher ROS-Abfall in den Mitochondrien festgestellt werden (Abbildung 48). Das ROS-induzierende Rotenon (Rot) wurde als Positivkontrolle verwendet und bestätigt (Abbildung 48).

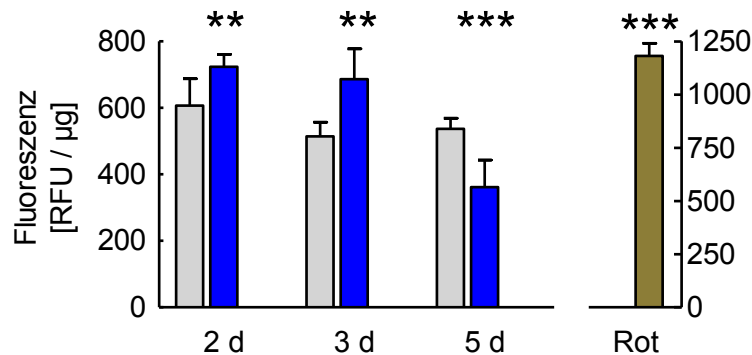


Abbildung 48: Effekt von Ritalin auf die mitochondriale ROS-Produktion.

Abgebildet sind die mtROS-Spiegel nach zwei-, drei- und fünftägiger Inkubation mit bzw. ohne Ritalin. Es zeigten sich erhöhte mtROS-Level nach zweitägiger ($P = 0,002$) und dreitägiger ($P = 0,009$) Ritalin-Behandlung sowie einer Rotenon-Inkubation ($P < 0,0001$) und eine Senkung der mtROS-Produktion nach fünftägiger Ritalin-Behandlung ($P < 0,0006$). Dargestellt ist der $MW \pm STABW$; $n = 3$; grau: Kontrolle; blau: 5 µM Ritalin; braun: 1 µM Rotenon (Rot).

Anschließend wurde der Gehalt an Wasserstoffperoxid in den Nematoden mittels Amplex Red Fluoreszenz quantitativ bestimmt. Nach zweitägiger Ritalin-Behandlung zeigte sich ein tendenziell erhöhter H_2O_2 -Gehalt ($P = 0,059$) und nach dreitägiger Ritalin-Inkubation ein signifikanter Anstieg von H_2O_2 (Abbildung 49). Durch eine fünftägige Ritalin-Inkubation war ein tendenzieller Abfall von Wasserstoffperoxid erkennbar ($P = 0,07$; Abbildung 49).

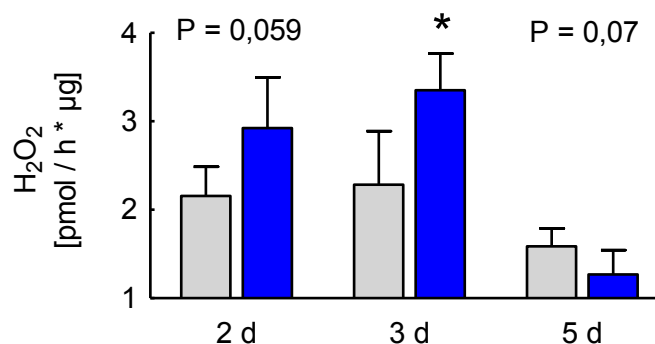


Abbildung 49: Effekt von Ritalin auf die Wasserstoffperoxidproduktion.

Abgebildet ist der H_2O_2 -Gehalt nach zwei-, drei- und fünftägiger Inkubation mit bzw. ohne Ritalin. Es zeigte sich eine erhöhte H_2O_2 -Produktion nach dreitägiger Ritalin-Behandlung ($P = 0,01$). Dargestellt ist der $MW \pm STABW$; $n=5$; grau: Kontrolle; blau: 5 µM Ritalin.

3.2.8 Effekte von Ritalin auf die Aktivität antioxidativer Enzyme

Bei der Untersuchung der Superoxiddismutase-Aktivität konnte keine Veränderung nach einer zweitägigen Inkubation mit Ritalin festgestellt werden (Abbildung 50). Infolge einer drei- bzw. fünftägigen Inkubation wurde hingegen eine deutliche erhöhte SOD-Aktivität beobachtet (Abbildung 50).

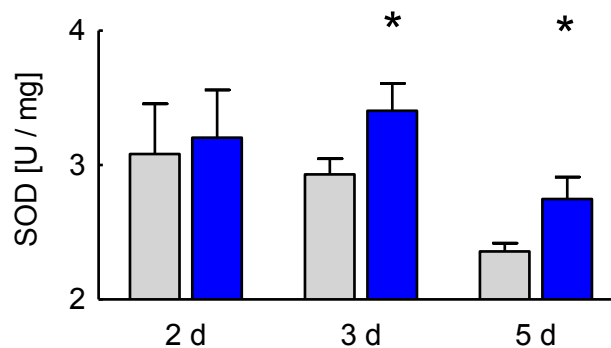


Abbildung 50: Effekt von Ritalin auf die SOD-Aktivität.

Abgebildet sind die Aktivitäten der SOD nach zwei-, drei- und fünftägiger Inkubation mit bzw. ohne Ritalin. Es zeigte sich eine erhöhte SOD-Aktivität nach dreitägiger ($P = 0,02$) und fünftägiger ($P = 0,01$) Ritalin-Behandlung. Dargestellt ist der MW \pm STABW; $n = 3$; grau: Kontrolle; blau: 5 μ M Ritalin.

Die Katalase-Aktivität nach zwei- und dreitägiger Ritalin-Behandlung unterschied sich nicht von der Kontrollgruppe (Abbildung 51). Eine längere Ritalin-Inkubation von fünf Tagen führte hingegen zu einer signifikant erhöhten Aktivität der Katalase (Abbildung 51).

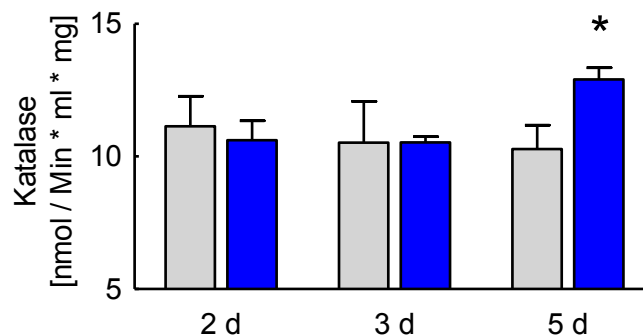


Abbildung 51: Effekt von Ritalin auf die Katalase-Aktivität.

Abgebildet sind die Aktivitäten der Katalase nach zwei-, drei- und fünftägiger Inkubation mit bzw. ohne Ritalin. Es zeigte sich eine erhöhte Katalase-Aktivität nach fünftägiger Ritalin-Behandlung ($P = 0,01$). Dargestellt ist der MW \pm STABW; $n = 3$; grau: Kontrolle; blau: 5 μ M Ritalin.

3.2.9 Auswirkung von Ritalin auf die oxidative Stressresistenz

Zur Untersuchung der oxidativen Stressresistenz wurden Nematoden mit bzw. ohne Ritalin für sechs Tage vorinkubiert und anschließend auf Paraquatplatten gesetzt. Paraquat induziert oxidativen Stress, sodass die Nematoden innerhalb von sieben bis acht Tagen sterben. Somit kann man durch die Analyse der Lebenszeit Rückschlüsse auf die Stressabwehr ziehen. Mit Ritalin-vorbehandelte Nematoden zeigten eine signifikant erhöhte oxidative Stressabwehr im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abbildung 52).

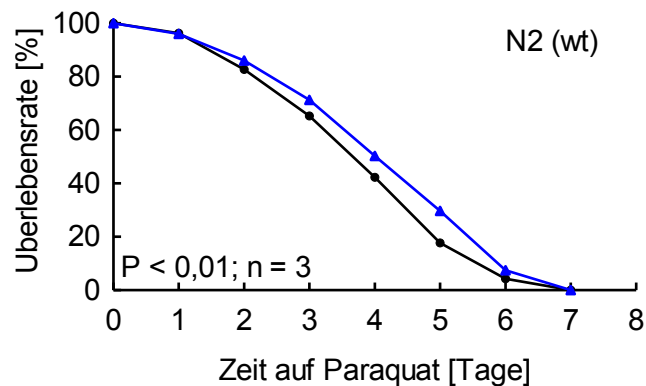


Abbildung 52: Effekt von Ritalin auf die Paraquat-Stressresistenz.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von Wildtyp-Nematoden (N2) in Anwesenheit von 10 mM Paraquat nach sechstägiger Vorinkubation mit bzw. ohne Ritalin. Es zeigte sich eine erhöhte Stressresistenz infolge der Ritalin-Vorinkubation ($P = 0,005$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; blau: 5 µM Ritalin.

3.2.10 Effekt von Ritalin auf die Lebenszeit in Gegenwart von einem Antioxidans

Zur Untersuchung der Notwendigkeit des initialen ROS-Anstiegs bei der Ritalin-vermittelten Lebensverlängerung wurde eine Lebenszeitanalyse von Nematoden durchgeführt, die sowohl mit Ritalin als auch gleichzeitig mit dem Antioxidans NAC (N-Acetyl-Cystein) inkubiert wurden. Zunächst wurde die Wirkung einer alleinigen NAC-Behandlung überprüft. Dabei konnte kein Effekt auf die Lebenserwartung festgestellt werden (Abbildung 53).

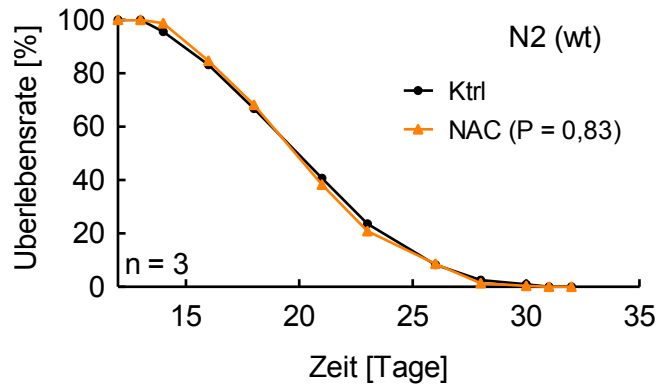


Abbildung 53: Effekt von NAC auf die Lebenserwartung.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von Wildtyp-Nematoden (N2) in An- und Abwesenheit von NAC (N-Acetyl-Cystein). Es zeigte sich keine Lebensverlängerung infolge einer NAC-Behandlung ($P = 0,83$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; orange: 1 mM NAC; weitere Informationen in Tabelle 9.

Weiterhin wurde die Lebenserwartung von Nematoden untersucht, welche mit Ritalin und NAC gleichzeitig behandelt wurden. Durch eine Inkubation mit Ritalin wurde, wie schon zuvor gezeigt, eine signifikante Lebensverlängerung in *C. elegans* ermittelt ($P < 0,0001$; Abbildung 54). Interessanterweise konnte dieser lebensverlängernde Effekt bei der kombinierten Verabreichung von Ritalin und NAC nicht mehr beobachtet werden (Abbildung 54).

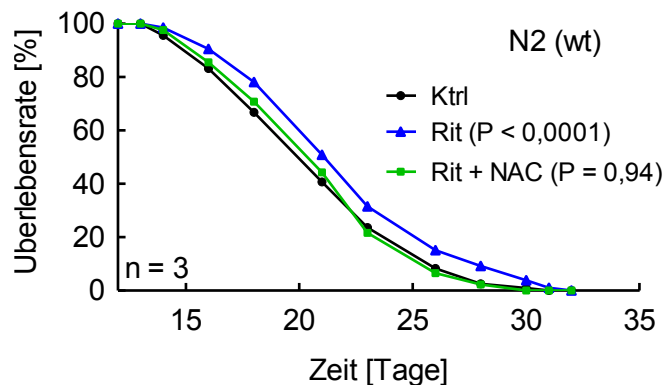


Abbildung 54: Effekt von Ritalin auf die Lebenserwartung in Anwesenheit von NAC.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von Wildtyp-Nematoden (N2) in An- und Abwesenheit von Ritalin und BHA (Butylhydroxyanisol). Es zeigte sich eine Aufhebung der Ritalin-vermittelten Lebensverlängerung durch eine gleichzeitige Inkubation von Ritalin und BHA ($P = 0,94$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle (Ktrl); blau: 5 μ M Ritalin (Rit); grün: 5 μ M Ritalin + 1 mM NAC (Rit + NAC); weitere Informationen in Tabelle 9.

3.2.11 Wirkung von Ritalin auf ROS-Sensoren

Im Folgenden wurde der Einfluss von Ritalin auf verschiedene ROS-Sensoren analysiert. Dazu wurde zunächst die Stresskinase p38 untersucht. Mittels Western Blot konnte eine verstärkte Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase (*C. elegans* Ortholog: PMK-1) nach einer dreitägigen Ritalin-Behandlung festgestellt werden (Abbildung 55). Die PMK-1 defiziente Mutante zeigte, wie erwartet, kein Signal bei der Detektion von Phospho-p38 MAPK/PMK-1 (Abbildung 55).

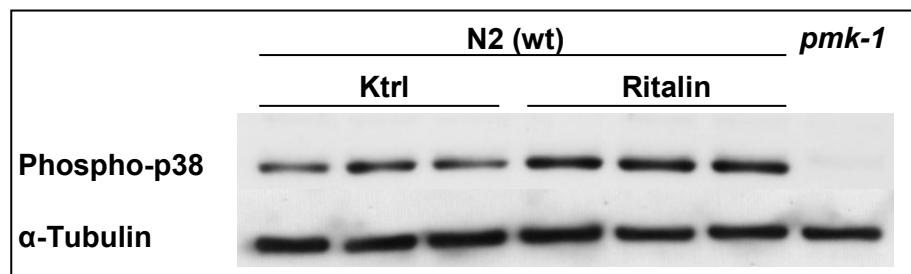


Abbildung 55: Effekt von Ritalin auf die Aktivierung der p38 MAPK/PMK-1.

Abgebildet sind die Western Blots von Lysaten aus unbehandelten und Ritalin- (5 μ M, 3 d) behandelten Wildtyp-Nematoden sowie aus unbehandelten PMK-1 defizienten Nematoden. Es zeigte sich eine verstärkte Phosphorylierung der p38 MAPK/PMK-1 nach einer Ritalin-Inkubation. Die PMK-1 defiziente Mutante zeigte kein Phospho-p38 MAPK/PMK-1 Signal.

Anschließend erfolgte einer Lebensspannenanalyse von PMK-1 defizienten Mutanten in An- und Abwesenheit von Ritalin, um die Involvierung dieser Stresskinase bei der Ritalin-vermittelten Lebensverlängerung zu untersuchen. Hierbei zeigte sich, dass der durch Ritalin verursachte lebensverlängernde Effekt in Wildtyp-Nematoden in den PMK-1 defizienten Nematoden vollständig aufgehoben wurde (Abbildung 56).

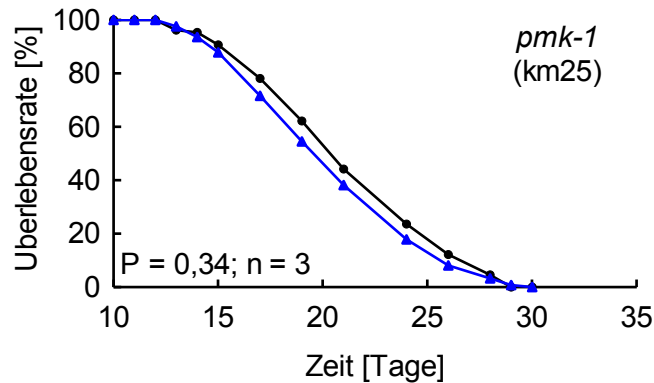


Abbildung 56: Effekt von Ritalin auf die Lebenserwartung von *pmk-1* Mutanten.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von PMK-1 defizienten Nematoden in An- und Abwesenheit von Ritalin. Es zeigte sich keine Lebensverlängerung infolge der Ritalin-Behandlung ($P = 0,34$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; blau: 5 μM Ritalin; weitere Informationen in Tabelle 9.

Weiterhin wurde der Einfluss des Transkriptionsfaktors NRF2 (*C. elegans* Ortholog: SKN-1) bei der Lebensverlängerung durch eine Ritalin-Behandlung untersucht. SKN-1 wird in den zwei ASI-Neuronen und im Intestinum exprimiert. Zunächst erfolgte eine Lebensspannenanalyse der *C. elegans* Mutante, welche ein intestinales und neuronales SKN-1 Knockout (zu135) besitzt. Bei dieser SKN-1 defizienten Mutante (zu135) konnte keine Lebensverlängerung nach einer Inkubation mit Ritalin beobachtet werden (Abbildung 57).

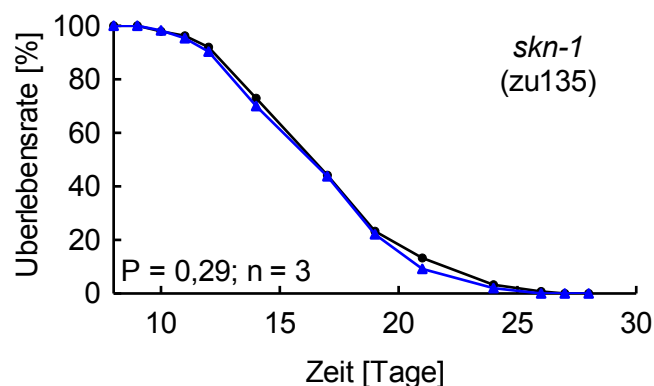


Abbildung 57: Effekt von Ritalin auf die Lebenserwartung von *skn-1* (zu135) Mutanten.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von SKN-1 (zu135) defizienten Nematoden in An- und Abwesenheit von Ritalin. Es zeigte sich keine Lebensverlängerung infolge der Ritalin-Behandlung ($P = 0,29$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; blau: 5 μM Ritalin; weitere Informationen in Tabelle 9.

Anschließend wurde eine Analyse der Lebenserwartung von *skn-1* Mutanten durchgeführt, welche nur ein intestinales Knockout besitzen und in denen SKN-1 in den Neuronen weiterhin exprimiert wird. Hierbei konnte eine signifikante Lebensverlängerung durch eine Behandlung mit Ritalin festgestellt werden (Abbildung 58).

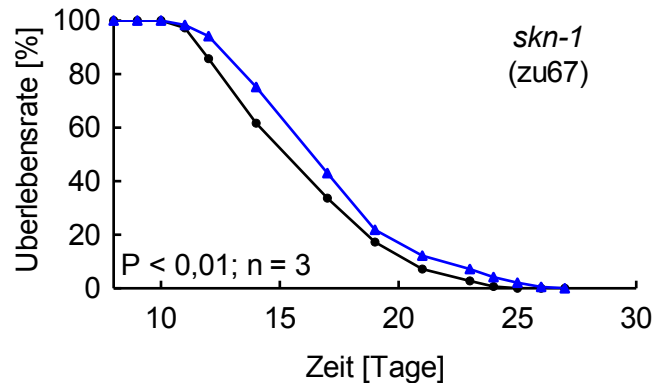


Abbildung 58: Effekt von Ritalin auf die Lebenserwartung von *skn-1* (zu67) Mutanten.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von SKN-1 (zu67) defizienten Nematoden in An- und Abwesenheit von Ritalin. Es zeigte sich eine Lebensverlängerung infolge der Ritalin-Behandlung ($P = 0,0051$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; $P = 0,0051$; schwarz: Kontrolle; blau: 5 μ M Ritalin; weitere Informationen in Tabelle 9.

Bisher existiert keine *C. elegans* Mutante mit einem neuronalen SKN-1 Knockout. Deshalb wurde für eine weitere Lebenszeituntersuchung der *C. elegans* Stamm CX3596 [*ky/s128 lin-15B(n765) X.*] verwendet, welcher GFP (grün-fluoreszierendes Protein) von einem ASI-spezifischen *str-3* Promotor exprimiert. Mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops konnten somit die ASI-Neuronen in den *ky/s128* Mutanten durch Laserstrahlung ablatiert werden. Bei der anschließenden Analyse der Lebensspanne der ASI-ablatierten Nematoden konnte kein lebensverlängernder Effekt durch eine Ritalin-Behandlung beobachtet werden (Abbildung 59).

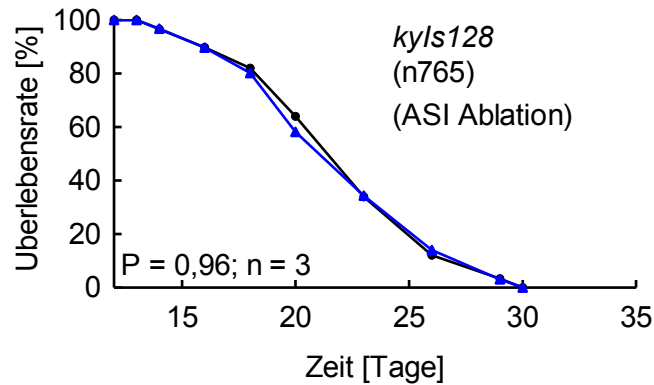


Abbildung 59: Effekt von Ritalin auf die Lebenszeit von *kyls128* Mutanten (ASI-Ablation).

Abgebildet sind die Überlebenskurven von ASI-ablatierten *kyls128* Mutanten in An- und Abwesenheit von Ritalin. Es zeigte sich keine Lebensverlängerung infolge einer Ritalin-Behandlung ($P = 0,96$). Dargestellt ist der MW aus $n=3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; blau: 5 μM Ritalin; weitere Informationen in Tabelle 9.

Um auszuschließen, dass die kurzzeitige Betäubung und Fixierung der Nematoden während der Ablation den lebensverlängernden Effekt von Ritalin aufgehoben hat, erfolgte eine Analyse der Lebenserwartung von *kyls128* Mutanten, bei denen die ASI-Neuronen nicht mittels Laserstrahlung ablatiert wurden, aber ansonsten die gleiche Prozedur erfuhren. Hierbei konnte eine Lebensverlängerung durch eine Behandlung mit Ritalin festgestellt werden (Abbildung 60).

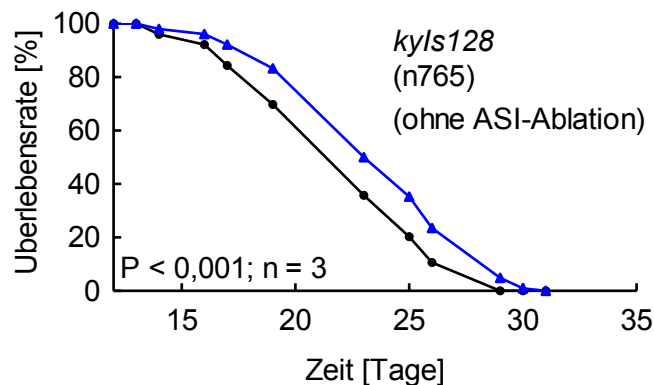


Abbildung 60: Effekt von Ritalin auf die Lebenszeit von *kyls128* Mutanten (ohne Ablation).

Abgebildet sind die Überlebenskurven von nicht-ASI-ablatierten *kyls128* Mutanten in An- und Abwesenheit von Ritalin. Es zeigte sich eine Lebensverlängerung infolge einer Ritalin-Behandlung ($P = 0,0008$). Dargestellt ist der MW aus $n=3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; blau: 5 μM Ritalin; weitere Informationen in Tabelle 9.

Außerdem wurde der Einfluss von DAF-16, ein Transkriptionsfaktor der Forkhead-Familie (FOXO), bei der Ritalin-vermittelten Lebensverlängerung untersucht und eine Lebenszeitanalyse von DAF-16-defizienten Nematoden durchgeführt. Die zuvor gezeigte Lebensverlängerung durch Ritalin in Wildtyp-Nematoden konnte in den *daf-16* Mutanten nicht mehr beobachtet werden (Abbildung 61).

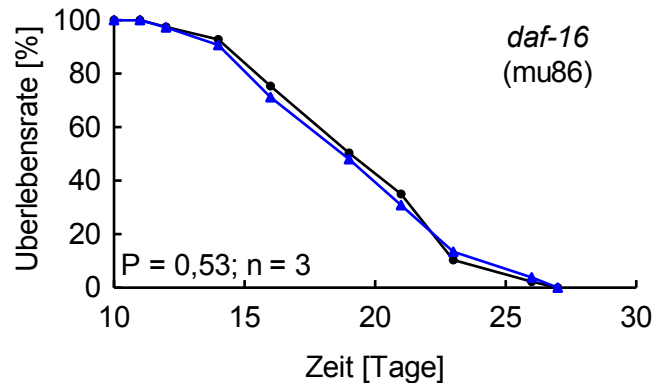


Abbildung 61: Effekt von Ritalin auf die Lebenserwartung von *daf-16* Mutanten.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von DAF-16 defizienten Nematoden in An- und Abwesenheit von Ritalin. Es zeigte sich keine Lebensverlängerung infolge einer Ritalin-Behandlung ($P = 0,53$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; blau: 5 μM Ritalin; weitere Informationen in Tabelle 9.

3.2.12 Einfluss von Dopamin bei der Ritalin-vermittelten Lebensverlängerung

3.2.12.1 Effekt von Ritalin auf die Lebenserwartung von Dopamin-Mutanten

Ritalin kann durch seine Hemmung des Dopaminwiederaufnahmetransporters (DAT) den Metabolismus von Dopamin beeinflussen. Daher folgten Lebensspannenanalysen von verschiedenen *C. elegans* Mutanten, die im Dopamin-Stoffwechsel involviert sind.

Zunächst erfolgte eine Analyse der Lebensspanne von *cat-2* Mutanten, welche ein Knockout in der Tyrosinhydroxylase besitzen und somit kein Dopamin synthetisieren können. Dabei zeigte sich, dass eine Inkubation mit Ritalin die Lebenserwartung der *cat-2* Mutanten nicht beeinflusst (Abbildung 62).

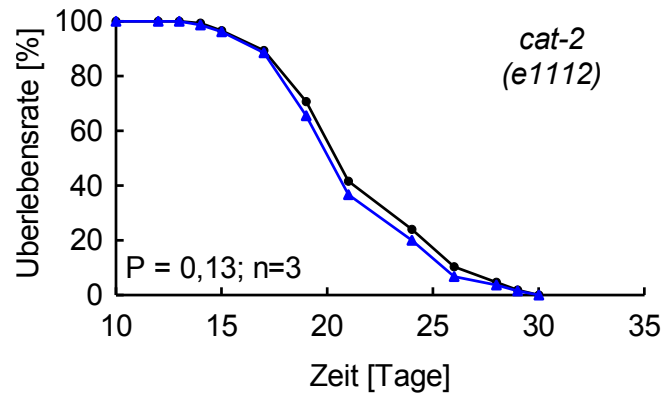


Abbildung 62: Effekt von Ritalin auf die Lebenserwartung von *cat-2* Mutanten.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von CAT-2 defizienten Nematoden in An- und Abwesenheit von Ritalin. Es zeigte sich keine Lebensverlängerung infolge einer Ritalin-Behandlung ($P = 0,13$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; blau: 5 μM Ritalin; weitere Informationen in Tabelle 9.

Um zu prüfen, ob die Hemmung des Dopaminwiederaufnahmetransporters durch Ritalin bei der Ritalin-vermittelten Lebensverlängerung mit beteiligt ist, wurde eine Lebenszeitanalyse von *dat-1* Mutanten (Knockout im Dopamintransporter) in An- und Abwesenheit von Ritalin durchgeführt. Hierbei konnte keine Lebensverlängerung durch die Behandlung mit Ritalin festgestellt werden (Abbildung 63).

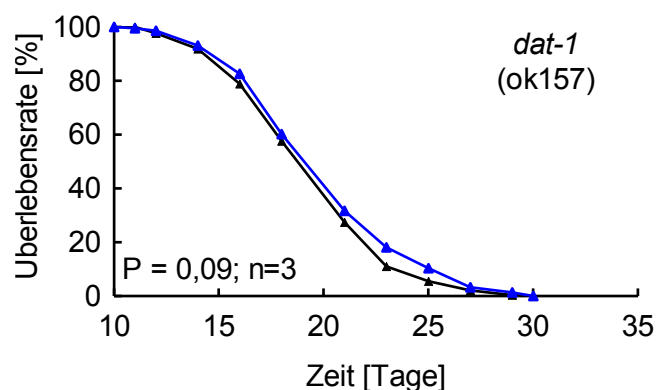


Abbildung 63: Effekt von Ritalin auf die Lebenserwartung von *dat-1* Mutanten.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von DAT-1 defizienten Nematoden in An- und Abwesenheit von Ritalin. Es zeigte sich keine Lebensverlängerung infolge einer Ritalin-Behandlung ($P = 0,09$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; blau: 5 μM Ritalin; weitere Informationen in Tabelle 9.

Weiterhin wurde der Einfluss der Dopaminrezeptoren bei der Ritalin-vermittelten Lebensverlängerung untersucht. Dazu wurde der *C. elegans* Stamm LX734 verwendet, welcher ein Knockout in den Dopaminrezeptoren 1 und 2 besitzt. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit Ritalin keinen Effekt auf die Lebenserwartung von LX734 ausübte (Abbildung 64).

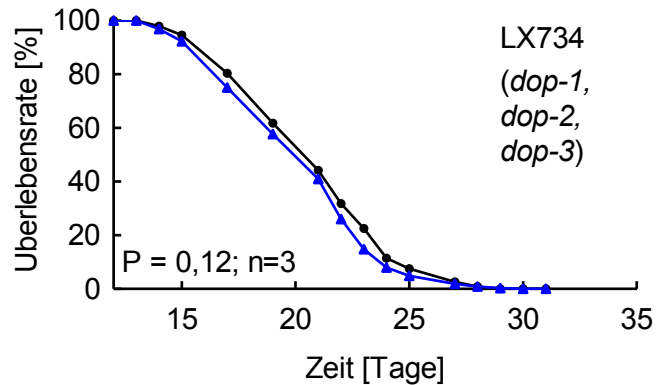


Abbildung 64: Effekt von Ritalin auf die Lebenszeit von Dopaminrezeptor-Mutanten.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von Dopaminrezeptor-Mutanten (*dop-1*, *dop-2*, *dop-3*) in An- und Abwesenheit von Ritalin. Es zeigte sich keine Lebensverlängerung infolge einer Ritalin-Behandlung ($P = 0,12$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; blau: 5 µM Ritalin; weitere Informationen in Tabelle 9.

3.2.12.2 Effekt von Dopamin auf die Lebenserwartung

In Wildtyp-Nematoden führte eine Inkubation mit Dopamin zu einer signifikanten Lebensverlängerung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abbildung 65). Durch eine gleichzeitige Behandlung mit Dopamin und Ritalin wurde ebenfalls die Lebensspanne deutlich verlängert, jedoch ergab sich keine signifikante Verstärkung der Dopamin-vermittelten Lebensverlängerung (Abbildung 65).

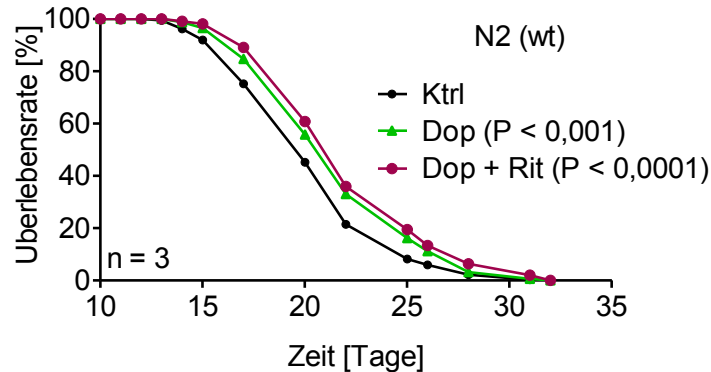


Abbildung 65: Effekt von Dopamin auf die Lebenserwartung.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von Wildtyp-Nematoden (N2) in An- und Abwesenheit von Dopamin (Dop) und Ritalin + Dopamin (Dop + Rit). Es zeigte sich eine Lebensverlängerung infolge einer Dopamin-Behandlung ($P < 0,001$) und bei gleichzeitiger Inkubation von Dopamin und Ritalin ($P < 0,0001$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; grün: 10 μM Dopamin; violett: 10 μM Dopamin + 5 μM Ritalin; (Dop vs. Dop + Rit: $P = 0,06$); weitere Informationen in Tabelle 9.

3.2.12.3 Auswirkung von Dopamin auf die oxidative Stressresistenz

Nach der Analyse der Lebensspanne, wurde die Stressresistenz gegenüber dem ROS-induzierenden Paraquat getestet. Nach einer Vorinkubation mit bzw. ohne Dopamin wurden die Nematoden auf Paraquatplatten gesetzt, um die Überlebensrate zu bestimmen. Es konnte eine signifikant erhöhte oxidative Stressresistenz der Dopamin-vorbehandelten Nematoden im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abbildung 66).

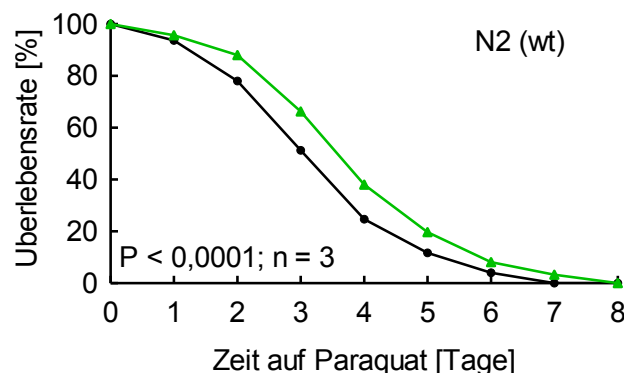


Abbildung 66: Effekt von Dopamin auf die Paraquat-Stressresistenz.

Abgebildet sind die Überlebenskurven von Wildtyp-Nematoden (N2) in Anwesenheit von 10 mM Paraquat nach sechstägiger Vorinkubation mit bzw. ohne Dopamin. Es zeigte sich eine erhöhte Stressresistenz infolge der Dopamin-Vorinkubation ($P < 0,0001$). Dargestellt ist der MW aus $n = 3$ Experimenten; schwarz: Kontrolle; grün: 10 μM Dopamin.

3.2.12.4 Wirkung von Dopamin auf die Nahrungsaufnahme

Es erfolgte eine Messung der *E. coli*-Aufnahme von Nematoden in Anwesenheit von jeweils Dopamin und Ritalin allein und in Kombination. Eine zweitägige Dopamin-Behandlung führte zu einer deutlich verringerten Nahrungsaufnahme (Abbildung 67). Die Inkubation mit Ritalin zeigte, wie zuvor schon erwähnt, eine signifikante Reduktion der *E. coli*-Aufnahme (Abbildung 67). Durch eine gleichzeitige Verabreichung von Ritalin und Dopamin konnte eine signifikante, aber keine verstärkte, Hemmung der Nahrungsaufnahme beobachtet werden (Abbildung 67). Als Positivkontrolle wurde erneut die *eat-2* Mutante verwendet, welche signifikant weniger Bakteriennahrung zu sich nahm (Abbildung 67).

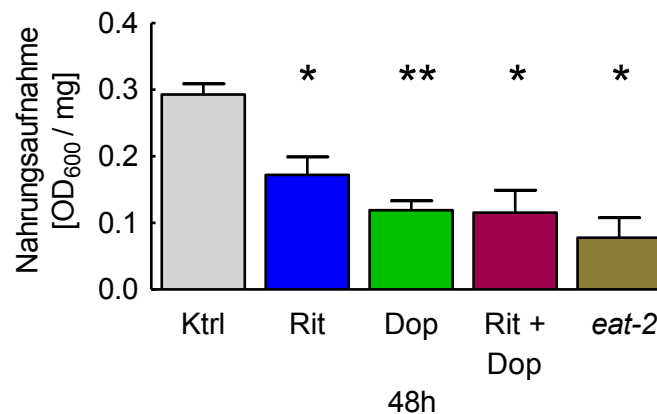


Abbildung 67: Effekt von Dopamin und Ritalin auf die Nahrungsaufnahme.

Abgebildet ist die *E. coli*-Aufnahme nach zweitägiger Inkubation mit bzw. ohne Ritalin und Dopamin. Es zeigte sich eine Reduktion der Nahrungszufuhr durch eine Ritalin-Behandlung ($P = 0,03$), eine Dopamin-Inkubation ($P = 0,008$), eine kombinierte Verabreichung von Dopamin und Ritalin ($P = 0,02$) sowie in den *eat-2* Mutanten ($P = 0,012$). Dargestellt ist der MW \pm STABW; $n = 3$; grau: Kontrolle; blau: 5 μ M Ritalin (Rit); grün: 10 μ M Dopamin (Dop); violett: 5 μ M + 10 μ M Dopamin (Rit + Dop); braun: *eat-2* Mutanten.

Weiterhin wurde die Nahrungsaufnahme von *dat-1* Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Nematoden untersucht. Es zeigte sich, dass die Nematoden mit einem Knockout im Dopamintransporter stark signifikant weniger Nahrung aufnahmen (Abbildung 68). *Eat-2* Mutanten wurden hier abermals als Positivkontrolle verwendet und bestätigt (Abbildung 68).

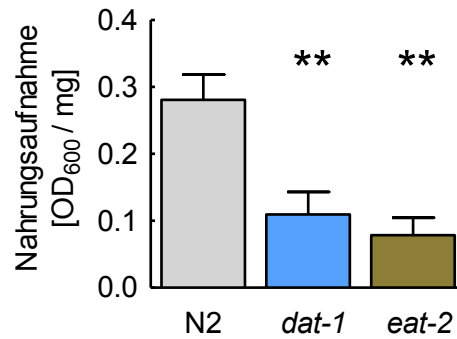


Abbildung 68: Effekt von *dat-1* Mutanten auf die Nahrungsaufnahme.

Abgebildet ist die *E. coli*-Aufnahme von Wildtyp-Nematoden, DAT-1defizienten Mutanten und EAT-2 Mutanten, wobei sich eine Reduktion der Nahrungszufuhr in den *dat-1* ($P = 0,004$) und *eat-2* Mutanten ($P = 0,008$) zeigte. Dargestellt ist der MW \pm STABW; $n = 3$; grau: Kontrolle; hellblau: *dat-1* Mutanten; grün: *eat-2* Mutanten.

3.2.12.5 Auswirkung von Dopamin auf den Energiegehalt

Es wurde der Einfluss von Dopamin auf den ATP-Gehalt analysiert. Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion der ATP-Menge nach zweitägiger Behandlung mit Dopamin, welche nach fünftägiger Dopamin-Inkubation wieder ausgeglichen war (Abbildung 69).

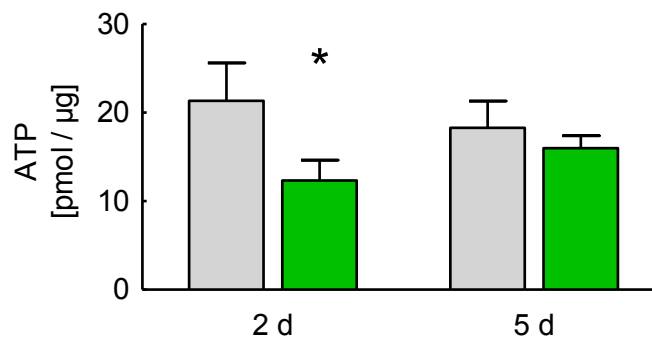


Abbildung 69: Effekt von Dopamin auf den ATP Gehalt.

Abgebildet sind die ATP-Spiegel nach zwei- und fünftägiger Inkubation mit bzw. ohne Dopamin (grün). Es zeigte sich ein Abfall der ATP-Gehaltes nach zweitägiger Dopamin-Behandlung ($P = 0,03$). Dargestellt ist der MW \pm STABW; $n = 3$; grau: Kontrolle; grün: 10 µM Dopamin.

4 Diskussion

Die Kalorienrestriktion gehört zu den wichtigsten Interventionen zur Verlangsamung des Alterungsprozesses, zur Verbesserung von altersabhängigen Erkrankungen und zur Verlängerung der Lebenserwartung [Ristow und Schmeisser 2011]. Im *C. elegans* Modell konnte bereits eine erhebliche Lebensverlängerung infolge einer 2-Deoxy-D-Glukose (DOG)-vermittelten Glucoserestriktion festgestellt werden [Schulz *et al.* 2007]. Der hier verwendete Aminosucker Glucosamin (GlcN) kann, ähnlich wie DOG, den Glukosestoffwechsel beeinträchtigen. Er hemmt den Transport von Glukose in die Zelle [Baron *et al.* 1995, Hawkins *et al.* 1996, Hresko *et al.* 1998, Nelson *et al.* 2000, Robinson *et al.* 1993, Rogacka *et al.* 2010, Shikhman *et al.* 2009, Uldry *et al.* 2002] und inhibiert die Hexokinase bzw. Glukokinase [Balkan und Dunning 1994, Barzilai *et al.* 1996, Oguchi *et al.* 1977, Silverman 1963, Van Schaftigen 1995, Vandercammen und Van Schaftingen 1991, Virkamaki und Yki-Jarvinen 1999]. Eine GlcN-induzierte Störung des Glukosemetabolismus konnte in dieser Arbeit im *C. elegans* Modell bestätigt werden. Eine dreistündige Behandlung mit GlcN verringerte deutlich die Glukoseaufnahme und eine 24-stündige GlcN-Inkubation reduzierte die Glukoseoxidation um ca. 43 %. Dabei konnte aber ausgeschlossen werden, dass diese Ergebnisse aufgrund der verringerten Nahrungszufuhr zustande kamen, da die Anwesenheit von GlcN die Bakterienaufnahme der Nematoden nicht beeinflusste. Eine kurzzeitige Verabreichung von hohen Dosen des Aminosuckers führte in verschiedenen Modellorganismen [Marshall *et al.* 1991, Patti *et al.* 1999, Robinson *et al.* 1993] und auch beim Menschen [Hawkins *et al.* 1996, Monauni *et al.* 2000] zu einer akuten Beeinträchtigung des Glukosestoffwechsels. Eine chronische Verabreichung von GlcN hatte aber keine negativen Effekte beim Menschen zur Folge [Anderson *et al.* 2005, Simon *et al.* 2011]. Die durch GlcN verursachte Hemmung des Glukosemetabolismus könnte, ähnlich wie nach einer DOG-Inkubation [Schulz *et al.* 2007], zu der signifikant verlängerten Lebensspanne der GlcN-inkubierten Nematoden geführt haben. Sogar beim Menschen gibt es Hinweise, dass eine Supplementierung von GlcN das Risiko der totalen Mortalität verringern kann [Pocobelli *et al.* 2010].

Für die zweite untersuchte Substanz Ritalin konnte ebenfalls ein lebensverlängernder Effekt in *C. elegans* nachgewiesen werden. Es wurde zusätzlich die motorische Aktivität der Individuen bestimmt, da dieser Lebensparameter ein oft untersuchtes Merkmal in der Altersforschung ist und im Laufe des Lebens abnimmt [Dean *et al.* 1981, Le Bourg 1987,

Lee *et al.* 2006]. Nach einer zehntägigen Inkubation mit Ritalin zeigte sich eine signifikant erhöhte Beweglichkeit der Nematoden, welche mit der Verbesserung der Lebenserwartung assoziiert sein könnte. Mehrere Publikationen beschreiben ebenfalls eine Bewegungssteigerung von Ratten und Meerschweinchen infolge einer Ritalin-Verabreichung [Fregly und Black 1964, Levant *et al.* 2011, Schreiber *et al.* 1976, Wooters *et al.* 2011]. Dabei wurde die Erhöhung der spontanen motorischen Aktivität mit der Ritalin-induzierten Hemmung des Dopaminwiederaufnahmetransporters und dem damit verbundenen Anstieg von extrazellulärem Dopamin in Verbindung gebracht [Knab *et al.* 2012, Walker *et al.* 2010].

Weiterhin wurde die Pharynxpumpfrequenz in *C. elegans* und die Aufnahme der Bakterienmenge unter Ritalin-Behandlung bestimmt. Nach einer zweitägigen Inkubation mit Ritalin zeigte sich eine deutliche Verringerung der Pharynxkontraktion und eine damit einhergehende Reduktion der Bakterienaufnahme. Übereinstimmend dazu belegen verschiedene Studien, dass die Einnahme von Ritalin die Nahrungs-, [Davis *et al.* 2012, Elfers und Roth 2011, Fregly und Black 1964] Zucker- [Bello und Hajnal 2006] und Fettaufnahme [Goldfield *et al.* 2007] bzw. allgemein die Energieaufnahme [Goldfield *et al.* 2007, Leddy *et al.* 2004] in Tieren und Menschen hemmt und somit das Körpergewicht reduziert werden kann [Elfers und Roth 2011]. Ferner konnte auch in *C. elegans* eine starke Abnahme der Pharynxpumpfrequenz und der Nahrungsaufnahme infolge einer Methamphetamin-Behandlung festgestellt werden [Schreiber und McIntire 2011]. Durch die Ritalin-verursachte Reduktion der Nahrungszufuhr könnte ein Zustand der Kalorienrestriktion erreicht worden sein, der für den beobachteten lebensverlängernden Effekt verantwortlich war. Die Verminderung der Bakterienaufnahme könnte auch den gesenkten Fettgehalt in den Ritalin-behandelten Nematoden erklären. Außerdem wäre es möglich, dass die reduzierte Nahrungszufuhr zu der erhöhten Bewegungsaktivität geführt hat, wie es schon in Mäusen [Denny *et al.* 2006] und in *C. elegans* [Lee *et al.* 2006] beschrieben wurde.

Die Inhibierung der Nahrungszufuhr durch Ritalin und die GlcN-vermittelte Glukoserestriktion führten in beiden Fällen zu einem Abfall des ATP-Gehaltes nach einer kurzen Inkubation mit der jeweiligen Substanz. Andere Studien konnten ebenfalls einen ATP-Abfall durch eine Inkubation mit GlcN belegen [Hresko *et al.* 1998, Marshall *et al.* 2004, Nelson *et al.* 2000, Tesoriere *et al.* 1975]. Für die Substanz Ritalin wurde von Fagundes und Kollegen eine Inhibierung der mitochondrialen Respiration beobachtet,

indem die Komplexe der Atmungskette, insbesondere Komplex-1, gehemmt wurden [Fagundes *et al.* 2010a, Fagundes *et al.* 2010b]. Dies könnte folglich auch in einem ATP-Abfall resultieren. Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit keine Komplex-1-Inhibierung durch die hier verwendete geringe Konzentration an Ritalin festgestellt, sodass eher die Hemmung der Nahrungsaufnahme die Senkung des ATP-Gehaltes erklärt.

Durch die Reduktion der verfügbaren Energie infolge einer GlcN- und Ritalin-Behandlung wurde der Energiesensor AMPK (*C. elegans* Ortholog: AAK-2) aktiviert, welcher die Zelle vor Energiemangel schützt, indem er energieverbrauchende Biosynthesen hemmt und katabolische Stoffwechselwege, die ATP generieren, ankurbelt [Hardie 2011]. So wird u. a. die Glukoseaufnahme durch die Aktivierung von GLUT1 (Glukosetransporter 1) [Barnes *et al.* 2002] und GLUT4 [Chen *et al.* 2008, Holmes *et al.* 1999, Kurth-Kraczek *et al.* 1999, McGee *et al.* 2008, Pehmoller *et al.* 2009] gefördert und die Glykolyse [Marsin *et al.* 2000, Marsin *et al.* 2002] sowie die Fettsäureoxidation [Merrill *et al.* 1997] gesteigert. Weiterhin wird die Glykogensynthese [Hardie 2007, Hoppe *et al.* 2009], die Glukoneogenese [Koo *et al.* 2005, Mihaylova *et al.* 2011] und Fettsäuresynthese [Li *et al.* 2011, Zhou *et al.* 2001] inhibiert. Zusätzlich stimuliert AMPK die Nahrungsaufnahme [Andersson *et al.* 2004, Minokoshi *et al.* 2004], wodurch möglicherweise die Hemmung der Bakterienaufnahme in *C. elegans* nach fünftägiger Ritalin-Behandlung im Vergleich zum früheren Zeitpunkt leicht verringert wurde.

Die verstärkte Aktivierung bzw. Threoninphosphorylierung der AAK-2/AMPK durch GlcN bzw. Ritalin konnte mittels Western Blot nachgewiesen werden. Folglich erklärt die Phosphorylierung der AMPK den Ausgleich des ATP-Gehaltes nach siebentägiger GlcN-Inkubation und fünftägiger Ritalin-Behandlung. Außerdem könnten die Fettdepots nach einer drei- und fünftägigen Ritalin-Inkubation abgebaut worden sein, um dem Energiemangel entgegenzuwirken.

Der lebensverlängernde Effekt von GlcN bzw. Ritalin wurde zudem in der AAK-2 defizienten Mutante aufgehoben, sodass die GlcN- bzw. Ritalin-vermittelte Lebensverlängerung von AMPK/AAK-2 abhängig sein muss. Dementsprechend konnten Apfeld *et al.* zeigen, dass Hunger und anderer Stress in Nematoden zu einer Verlängerung der Lebenserwartung führt, die eine der beiden katalytischen Untereinheiten der AMPK/AAK-2 bedingt [Apfeld *et al.* 2004]. Greer und Kollegen begründeten ebenfalls die verlängerte Lebensspanne von *C. elegans* infolge einer Nahrungsbeschränkung durch die Aktivierung von AAK-2 [Greer und Brunet 2009, Greer *et al.* 2007]. Auch in *Drosophila* wurde die Abhängigkeit der

Kalorienrestriktions-vermittelten Langlebigkeit von der AMPK Aktivierung beschrieben [Stenesen *et al.* 2013].

Weiterhin wird eine Beteiligung von Sirtuinen an der Kalorienrestriktions-vermittelten Langlebigkeit befürwortet [Lin *et al.* 2000, Lin *et al.* 2002, Rogina und Helfand 2004, Tissenbaum und Guarente 2001, Wang und Tissenbaum 2006, Wood *et al.* 2004], aber auch dementiert [Greer und Brunet 2009, Kaeberlein *et al.* 2006, Lee *et al.* 2006, Tsuchiya *et al.* 2006]. Die SIR2.1 defizienten Nematoden zeigten in Anwesenheit von GlcN eine signifikante Verlängerung der Lebensspanne, wenngleich der lebensverlängernde Effekt im Vergleich zu Wildtyp-Nematoden reduziert war. Daher scheint SIR2.1 bei der GlcN-vermittelten Lebensverlängerung weniger bedeutend zu sein. Die von Schulz und Kollegen beobachtete Steigerung der Lebenserwartung durch DOG war ebenfalls nicht von SIR2.1 abhängig [Schulz *et al.* 2007].

Durch die Aktivierung von AMPK wird bekanntermaßen die Expression von PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha*) verstärkt, wodurch sowohl die mitochondriale Biogenese als auch die Expression der kernkodierten mitochondrialen Gene gefördert wird [Zong *et al.* 2002]. Dies konnte nach siebentägiger GlcN-Behandlung und nach zwei-, drei- bzw. fünftägiger Ritalin-Inkubation durch eine signifikant gesteigerte Zitratsynthaseaktivität bestätigt werden. Folglich konnte für den Aminosucker GlcN eine erhöhte Expression mitochondrialer Gene mittels Real-Time PCR gemessen werden. Die mitochondriale Aktivität wurde induziert, um dem kurzzeitigen Energiedefizit infolge der Glukoserestriktion durch verstärkte oxidative Phosphorylierung entgegenzuwirken. Einige Studien zeigten bereits eine Steigerung der mitochondrialen Biogenese und Respiration nach einer Kalorien- bzw. Glukoserestriktion [Bishop und Guarente 2007b, Lin *et al.* 2002, Nisoli *et al.* 2005, Schulz *et al.* 2007, Sharma *et al.* 2011, Zuin *et al.* 2010]. Dementsprechend konnte nach zweitägiger GlcN-Inkubation bzw. nach zwei-, und dreitägiger Behandlung mit Ritalin eine signifikant erhöhte Respirationsrate gemessen werden. Diese verstärkte mitochondriale Aktivität bewirkte den Ausgleich des ATP-Gehaltes nach siebentägiger Inkubation mit GlcN und nach fünftägiger Ritalin-Behandlung. Außerdem könnte die Induktion der Mitochondrien für die beobachtete Lebensverlängerung verantwortlich sein, wie es auch in anderen Publikationen beschrieben wurde [Bishop und Guarente 2007b, Schulz *et al.* 2007, Sharma *et al.* 2011, Zuin *et al.* 2010].

Eine verstärkte Atmung hat bekanntermaßen einen erhöhten Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zur Folge, welche als unvermeidbare Nebenprodukte des gesteigerten Elektronentransfers durch die Atmungskette entstehen [Dröge 2002, Rea und Johnson 2003]. Somit stellen die Mitochondrien die Hauptquelle der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies dar. Es erfolgte die Bestimmung der mitochondrialen ROS-Produktion unter der Verwendung des ROS-sensitiven Mitotracker Fluoreszenzfarbstoffes und die Messung der Wasserstoffperoxidmenge im Überstand mithilfe des Amplex Red Farbstoffes. Hierbei zeigte sich ein erhöhter mitochondrialer ROS-Gehalt nach zweitägiger Behandlung mit GlcN bzw. nach zwei- und dreitägiger Ritalin-Inkubation. Auch die H₂O₂-Produktion wurde durch die pharmakologischen Substanzen zu den jeweiligen Zeitpunkten signifikant oder zumindest tendenziell erhöht. Diese gesteigerte Menge an reaktiven Sauerstoffspezies könnte aus der zeitgleich gesteigerten Respiration resultieren. Eine erhöhte Produktion von ROS durch GlcN konnte bereits in Bakterien und Pflanzen gezeigt werden [Aiassa *et al.* 2012, Ju *et al.* 2009] und auch für Ritalin wurde die Induktion von oxidativem Stress in Ratten belegt [Gomes *et al.* 2009, Martins *et al.* 2006].

Interessanterweise war in *C. elegans* nach einer längeren GlcN-Inkubation von sieben Tagen und einer fünftägigen Ritalin-Behandlung die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies signifikant oder zumindest tendenziell reduziert. Diese Verringerung der ROS-Formationen könnte auf die zum selben Zeitpunkt signifikant erhöhte Aktivität der antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase und Katalase zurückzuführen sein. In Hefezellen wurde ebenfalls eine Aktivierung von antioxidativen Enzymen nach erhöhter ROS-Produktion infolge einer Glukoserestriktion beobachtet [Agarwal *et al.* 2005, Kharade *et al.* 2005, Piper *et al.* 2006] und auch in Nagetieren konnte die Induzierung der antioxidativen Abwehrmechanismen infolge einer Kalorienrestriktion bestätigt werden [Koizumi *et al.* 1987, Pieri *et al.* 1992, Rao *et al.* 1990, Semsei *et al.* 1989, Sreekumar *et al.* 2002, Xia *et al.* 1995, Youngman *et al.* 1992]. Zudem wurden dem Aminozucker GlcN antioxidative Eigenschaften nachgewiesen [Tiku *et al.* 2007, Yan *et al.* 2007]. Ju und Kollegen beschreiben außerdem die erhöhte Expression von GST (Glutathion-S-Transferase)-Genen infolge einer GlcN-induzierten Wasserstoffperoxidproduktion [Ju *et al.* 2009]. Weiterhin zeigte sich auch nach einer chronischen Behandlung mit Ritalin eine erhöhte SOD-Aktivität im Hippocampus und zerebralen Kortex von Ratten [Gomes *et al.* 2008].

C. elegans besitzt mindestens 6 Isoformen der SOD [Landis und Tower 2005], wobei *sod-1* und *sod-5* die zytosolischen CuZnSODs kodieren [Jensen und Culotta 2005, Larsen 1993], *sod-4* Gene zwei extrazelluläre CuZnSODs exprimieren [Fujii *et al.* 1998] und *sod-2* und

sod-3 für die mitochondrialen MnSOD Enzyme kodieren [Giglio *et al.* 1994, Hunter *et al.* 1997]. In *C. elegans* verlängerte eine Überexpression der *sod-1* die Lebenserwartung [Doonan *et al.* 2008]. Ein kompletter Mangel an SOD-Aktivität zeigte hingegen keinen Einfluss auf die Lebensspanne von *C. elegans*, allerdings wurde der Superoxiddismutase eine lebenswichtige Rolle bei der Antwort auf akute Stressfaktoren zu gesprochen [Van Raamsdonk und Hekimi 2012]. Weiterhin wurde auch in *Drosophila* eine Steigerung der Lebenserwartung durch eine Überexprimierung der Cu/ZnSOD und Katalase festgestellt [Orr und Sohal 1994]. Durch die Entgiftung der Sauerstoffanionen entsteht Wasserstoffperoxid, welches durch die Mitochondrienmembran leicht diffundieren kann und durch die Katalase zu Wasser und Sauerstoff umgewandelt wird [Fridovich 1978]. Im Modellorganismus *C. elegans* wurde bisher eine zytosolische und eine peroxisomale Isoform der Katalase entdeckt, die *ctl-1* und die *ctl-2*. Dabei wurde bei *ctl-1*- [Taub *et al.* 1999] sowie bei *ctl-2*-Knockout-Mutanten [Petriv und Rachubinski 2004] eine verkürzte Lebenserwartung nachgewiesen und eine Aktivierung der *ctl-1* im Hungerzustand bzw. in Dauerlarven vermutet [Taub *et al.* 1999]. Somit könnte der Anstieg in der SOD- und Katalase-Aktivität infolge einer GlcN und Ritalin-Exposition zu der gesteigerten Lebenserwartung in *C. elegans* geführt haben.

Diese erhöhte Aktivität der antioxidativen Enzyme erklärt vermutlich auch die gesteigerte ROS-Abwehr nach Langzeitbehandlung der Substanzen und die beobachtete oxidative Stressresistenz in GlcN- und Ritalin-vorbehandelten Nematoden. Mehrere Publikationen beobachteten ebenfalls, dass durch eine Glukose- bzw. Kalorienrestriktion kurzzeitig geringer Stress induziert wurde, welcher zu adaptiven Abwehrmechanismen führte, die die Stressresistenz und Lebenserwartung erhöhen konnten [Masoro 1998a, 1998b, 2007, Rattan und Demirovic 2010, Yu und Chung 2001]. Speziell für GlcN konnte diese erhöhte Stressresistenz auch schon in Hefezellen festgestellt werden [Dillemans *et al.* 2008]. Die gesteigerten endogenen Abwehrmechanismen infolge einer GlcN und Ritalin-Exposition könnten somit zu der Verbesserung der Lebenserwartung in den Nematoden geführt haben.

Zudem ist der beobachtete ROS-Anstieg für die GlcN bzw. Ritalin-vermittelte Lebensverlängerung notwendig, da in Anwesenheit der Antioxidantien NAC (N-Acetyl-Cystein) und BHA (Butylhydroxyanisol) der lebensverlängernde Effekt von GlcN bzw. Ritalin vollständig aufgehoben wurde. Viele Studien konnten ebenso keine gesundheitsfördernden Wirkungen von Antioxidantien darlegen [Cook *et al.* 2007, Czernichow *et al.* 2005, Czernichow *et al.* 2006, Greenberg *et al.* 1994, Kataja-Tuomola *et al.* 2008, Katsiki und

Manes 2009, Lin *et al.* 2009, Liu *et al.* 1999, Rautalahti *et al.* 1999, Sacco *et al.* 2003, Sesso *et al.* 2008, Song *et al.* 2009, Virtamo *et al.* 2000, Zureik *et al.* 2004]. Es wird sogar eine krankheitsfördernde Wirkung und Lebensverkürzung mit den Antioxidantien in Verbindung gebracht [Albanes *et al.* 1996, Bjelakovic *et al.* 2007, Lippman *et al.* 2009, Lonn *et al.* 2005, Omenn *et al.* 1996, Vivekananthan *et al.* 2003, Ward *et al.* 2007].

Im Folgenden werden die Signaltransduktionswege diskutiert, die bei der GlcN- und Ritalin-vermittelten Lebensverlängerung involviert sein könnten. Zunächst wurde die Stresskinase p38 untersucht, welche zu der Familie der mitogenaktivierten Proteinkinasen gehört, die zelluläre Mechanismen, wie Proliferation, Zelldifferenzierung, Zellzyklus, Zelltod und Entzündungsprozesse reguliert [Hommes *et al.* 2003, Lopez-Bergami 2011, Pearson *et al.* 2001]. Die p38 MAPK spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Adaption, der Homöostase und der zellulären Stressantwort [Chang und Karin 2001, Johnson und Lapadat 2002, Kyriakis und Avruch 2001]. So kann über die nachfolgende Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die Expression von antioxidativen Enzymen reguliert werden [Inoue *et al.* 2005, Kondo *et al.* 2005, Vrailas-Mortimer *et al.* 2011] und eine normale Lebenserwartung von z. B. *Drosophila* und *C. elegans* gewährleistet werden [Troemel *et al.* 2006, Vrailas-Mortimer *et al.* 2011]. Die Phosphorylierung der p38 MAPK (*C. elegans* Ortholog: PMK-1) infolge von oxidativen Stress konnte bereits im *C. elegans* Modell gezeigt werden [Inoue *et al.* 2005]. Des Weiteren kann diese Stresskinase durch die AMP-aktivierte Proteinkinase aktiviert werden [Li *et al.* 2005]. Nach einer zweitägigen Inkubation mit GlcN und dreitägigen Behandlung mit Ritalin konnte eine verstärkte Phosphorylierung der p38 MAPK mittels Western Blot detektiert werden. Dies könnte aus der zuvor aktivierten AMPK und/oder der erhöhten ROS-Produktion resultieren. Zudem ist diese Aktivierung der p38 MAPK/PMK-1 für die GlcN- und Ritalin-vermittelte Lebensverlängerung erforderlich, da bei *pmk-1*-Knockout-Mutanten keine verlängerte Lebensspanne durch eine GlcN- oder Ritalin-Exposition zu beobachten war.

Des Weiteren wurde der Einfluss des Transkriptionsfaktors NRF2 bei der GlcN- und Ritalin-vermittelten Lebensverlängerung erforscht, da er, wie die p38 MAPK/PMK-1, infolge von oxidativem Stress aktiviert wird [Inoue *et al.* 2005]. NRF2 gehört zu der Familie der Cap-N-Collar (CNC) Transkriptionsfaktoren [Xu *et al.* 2005]. SKN-1 ist das zugehörige *C. elegans* Ortholog von NRF2 und steuert die Expression von Genen zur Detoxifizierung und zellulären Reparatur und nimmt somit Einfluss auf die Stressresistenz und Lebenserwartung [Oliveira *et al.* 2009]. *Skn-1* Gene werden in *C. elegans* sowohl in den

ASI-Neuronen als auch im Darm exprimiert [An und Blackwell 2003]. ASI-Neuronen sind zwei sensorische, endokrine Nervenzellen im Kopfbereich von *C. elegans* und besitzen eine funktionale Ähnlichkeit zum Hypothalamus [Bishop und Guarente 2007a]. Bishop und Kollegen publizierten bereits, dass *skn-1* Gene in den ASI-Neuronen für die Kalorienrestriktions-vermittelte Lebensverlängerung verantwortlich sind [Bishop und Guarente 2007b]. Zudem ist eine verstärkte Expression von *skn-1* im Darm maßgeblich bei der oxidativen Stressresistenz und Verbesserung der Lebenserwartung beteiligt. In *C. elegans* kodieren die *skn-1* Gene für 3 Proteinisoformen, SKN-1A, SKN-1B, SKN-1C, welche sich durch unterschiedliche N-Termini unterscheiden [Bishop und Guarente 2007b]. *Skn-1a* und *skn-1c* werden im Intestinum exprimiert und *skn-1b* in den ASI-Neuronen. Unter basalen Bedingungen liegt NRF2 gebunden an Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) im Zytosol vor [Inoue *et al.* 2005]. Durch die Bindung des Repressors Keap-1 an NRF2 wird die proteasomale Degradation von NRF2 gefördert [Itoh *et al.* 1999]. Infolge oxidativen Stresses kann NRF2 durch die Modifizierung der Cysteinreste am Keap1 Protein und der entstehenden Konformationsänderungen von Keap1 abdissoziieren und in den Zellkern wandern [Kobayashi *et al.* 2006]. Die Aktivierung von NRF2 durch ROS wird auch über direkte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors durch verschiedene Kinasen, wie der p38 MAP-Kinase, erreicht [Boutten *et al.* 2011, Huang *et al.* 2000, Inoue *et al.* 2005, McCubrey *et al.* 2006]. Eine Hemmung von SKN-1 findet hingegen durch die Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) statt [An *et al.* 2005]. Nach Translokation von NRF in den Zellkern wird die Transkription antioxidativ wirkender und entgiftender Enzyme durch die Bindung an ARE angeregt [Venugopal und Jaiswal 1996] und die Expression von Phase 2- und antioxidativ wirkenden Enzymen, einschließlich Glutathion-S-Transferase (GSTs), Superoxiddismutase (SOD) und Katalase gefördert [An und Blackwell 2003, An *et al.* 2005, Inoue *et al.* 2005, Kobayashi und Yamamoto 2006, Nguyen *et al.* 2003].

Bei der Analyse der Lebensspanne von *skn-1* defizienten Mutanten (zu135; globaler Knockout) konnte keine gesteigerte Lebenserwartung durch eine Inkubation mit GlcN oder Ritalin beobachtet werden, was auf die Involvierung von SKN-1 bei der GlcN- bzw. Ritalin-vermittelte Lebensverlängerung schließen lässt. Somit könnte die Aktivierung von SKN-1 durch ROS bzw. durch die p38 MAPK/PMK-1 die erhöhte Aktivität der Superoxiddismutase und Katalase infolge der siebentägigen GlcN-Behandlung und der fünftägigen Inkubation mit Ritalin erklären. Ebenso könnte der Transkriptionsfaktor durch seine verstärkte Expression antioxidativer Enzyme die beobachtete Stressresistenz infolge einer GlcN- bzw. Ritalin-Vorinkubation hervorgerufen haben. Neben der Stressresistenz moduliert SKN-1 auch die Lebenserwartung. So zeigten *skn-1*-Mutanten eine verringerte oxidative

Stressresistenz und eine verkürzte Lebenserwartung im Vergleich zu Wildtyp-Nematoden, während eine Überexpression von SKN-1 zu einer verstärkten Stresstoleranz und Lebensverlängerung in *C. elegans* führte [An und Blackwell 2003, An *et al.* 2005, Tullet *et al.* 2008].

Außerdem wurde eine weitere Lebenszeitanalyse mit dem Pharmakon Ritalin in *skn-1* Mutanten (zu67) durchgeführt, die SKN-1 nur in ASI-Neuronen und nicht im Intestinum exprimieren. Hierbei zeigte sich eine signifikante Verlängerung der Lebensspanne der Ritalin-behandelten Nematoden. Schlussfolgernd ist die Expression von SKN-1 in den ASI-Neuronen für die Lebensverlängerung durch Ritalin notwendig. Bishop und Kollegen zeigten bereits, dass die Aktivierung von SKN-1 in den ASI-Neuronen für die Kalorienrestriktions (KR)-vermittelte Verlängerung der Lebensspanne notwendig ist [Bishop und Guarente 2007b]. So konnten sie keine Lebensverlängerung in *skn-1* Mutanten durch Kalorienrestriktion feststellen. Durch eine Überexpression von SKN-1 in den ASI-Neuronen und nicht im Intestinum war die KR-assozierte Steigerung der Lebensspanne wieder erkennbar. Des Weiteren könnte neuronales SKN-1 auch für die hier beobachtete Steigerung der Respiration verantwortlich sein, so wie es schon in der Literatur beschrieben wurde [Bishop und Guarente 2007b]. Zur weiteren Prüfung der Notwendigkeit der neuronalen Expression von SKN-1 bei der Lebensverlängerung infolge einer Ritalin-Behandlung, wurden in einem erneuten Experiment die beiden ASI-Neuronen in den Nematoden mithilfe eines Lasers ablatiert. Dazu wurden *kyls128*-Mutanten (n765) verwendet, welche GFP (grün-fluoreszierendes Protein) in den ASI-Neuronen exprimieren. Infolge der ASI-Ablation war keine Steigerung der Lebenserwartung durch eine Inkubation mit Ritalin mehr feststellbar. Übereinstimmend dazu beschrieben Bishop *et al.* eine Aufhebung der Kalorienrestriktions (KR)-vermittelten Lebensverlängerung durch Ablation der ASI-Neuronen und bewiesen damit die Notwendigkeit des neuronalen SKN-1 bei der KR-vermittelten Langlebigkeit [Bishop und Guarente 2007b]. Außerdem wurde eine Lebenszeitanalyse von *kyls128*-Mutanten (n765) ohne Ablation der ASI-Neuronen in An- und Abwesenheit von Ritalin durchgeführt. Hierbei wurde eine signifikante Verbesserung der Lebenserwartung nach einer Ritalin-Behandlung festgestellt. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Aufhebung der Lebensverlängerung aufgrund der kurzzeitigen Betäubung und Fixierung der Nematoden während der Ablation zustande kam.

Einige Studien befürworten eine protektive Wirkung von SKN-1 in neurodegenerativen Erkrankungen. So wurde ein schützender Effekt von NRF2, z. B. gegen Parkinson [Chen

et al. 2009, Trinh *et al.* 2008], Amyotrophe Lateralsklerose [Vargas *et al.* 2008] und Alzheimer [Dostal *et al.* 2010] beobachtet.

Morbus Alzheimer entsteht durch eine Akkumulation von fehlerhaft gefalteten beta-Amyloid (A β)-Peptiden, die sich mit den Neurofibrillen in Form von Knäueln in den Nervenzellen ablagern [Citron *et al.* 1992, Rovelet-Lecrux *et al.* 2006, Suzuki *et al.* 1994]. Das A β entsteht dabei aus dem APP (*amyloid-precursor protein*) durch die proteolytische β -Sekretase [Wilquet und De Strooper 2004]. Weiterhin gehört Alzheimer zu den Tauopathien, wobei eine verstärkte Phosphorylierung der Tau-Proteine in einer verstärkten Bündelbildung (Alzheimer-Fibrillen“) mit Zelluntergang resultiert [Grundke-Iqbal *et al.* 1986, Jackson *et al.* 2002]. In den neueren Publikationen wird eine direkte oder indirekte Interaktion zwischen A β und dem Tau-Protein beschrieben, wodurch dieses Neurofibrillengewirr beschleunigt wird. So kann das A β molekulare und zelluläre Signalwege beeinträchtigen, wodurch die Phosphorylierung, Aggregation, Fehlplatzierung und Akkumulation des Tau-Proteins begünstigt werden [Blurton-Jones und Laferla 2006]. Außerdem wird die Mitwirkung des oxidativen Stresses bei der Entwicklung der Alzheimer-Erkrankung in verschiedenen Studien mit Zellen, transgenen Tiermodellen und humanen postmortalem Material demonstriert [Nunomura *et al.* 2006].

Der Aminosucker GlcN spielt auch eine wichtige Rolle bei der neurodegenerativen Alzheimer-Erkrankung, weshalb seine Wirkung auf die A β -induzierten Paralyse in *C. elegans* getestet wurde. Dabei zeigte sich eine signifikant verringerte Paralyse der Nematoden durch die Behandlung mit GlcN. Da eine Nahrungsrestriktion die Proteinmissbildung und Ablagerung wirksam hemmen kann [Steinkraus *et al.* 2008], könnte die GlcN-verursachte Glucoserestriktion die positive Wirkung bezüglich der Paralyse hervorgerufen haben. Weiterhin führt ein verringertes Energieangebot zum verstärkten Protein-Turnover [Fostel *et al.* 2003] und Autophagie [Jia und Levine 2007], sodass infolge der GlcN-Behandlung auch vermehrt geschädigte Proteine abgebaut worden sein könnten. Die durch eine GlcN-Behandlung verringerte Paralyse könnte ebenso aus deren Aktivierung des Transkriptionsfaktors SKN-1 resultieren. Dostal und Kollegen beschreiben ebenfalls die protektive Wirkung ihres Kaffeeextraktes auf die A β -Toxizität durch eine SKN-1-Aktivierung [Dostal *et al.* 2010]. Weiterhin zeigte eine NRF2-Aktivierung in APP transgenen Mäuse [Kanninen *et al.* 2009, Kanninen *et al.* 2008] und in Nervenzellen nach einer exogenen A β -Exposition [Wruck *et al.* 2008] einen schützenden Effekt gegen Morbus Alzheimer. NRF2 erhöht zudem die Expression und Aktivität der Proteasomen [Arlt *et al.* 2009, Kapeta *et al.* 2010] und könnte so für eine Reduzierung der A β -Ablagerungen verantwortlich sein [Dostal *et al.* 2010, Park *et al.* 2009]. Es wäre auch denkbar, dass die Hochregulierung von

antioxidativen Genen durch diesen Transkriptionsfaktor die protektive Wirkung des Aminosuckers auf die A β -induzierte Paralyse hervorgerufen hat. Für Analoga des N-Acetylglucosamins zeigten Kisilevsky und Kollegen bereits, dass sie als Anti-Amyloid-Agenzien fungieren [Kisilevsky und Szarek 2002]. Zudem verstärkt eine GlcN-Inkubation die O-GlcNAcylierung, welche die Phosphorylierung des Tau-Proteins reduziert [Deng *et al.* 2009, Liu *et al.* 2009], sodass GlcN möglicherweise auch auf diesen Weg einen schützenden Effekt gegen die Alzheimer-Erkrankung ausüben kann.

Ein weiterer Regulator der Stressresistenz und Lebenserwartung in *C. elegans* ist der Transkriptionsfaktor DAF-16 (FOXO). Die FOXO-Transkriptionsfaktoren gehören zu der großen Gruppe der Forkhead-Proteine, welche durch eine DNA-Bindedomäne, die sogenannte Forkhead-Box, charakterisiert ist [Kaestner *et al.* 2000]. DAF-16 ist einer der wichtigsten Regulatoren der DAF-2 (einziger Insulin/ IGF-1 like Rezeptor in *C. elegans*) nachgeschaltet ist [Tatar *et al.* 2003] und bei der Regulation des Dauerstadiums beteiligt ist. Eine Mutation in DAF-2 verdoppelt die Lebenserwartung von *C. elegans*, wobei dieser Effekt von DAF-16 abhängig ist [Kenyon *et al.* 1993]. Die Hemmung des Insulin/IGF-1 Signalweges führt zur reduzierten Aktivität der PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) und AKT, wodurch DAF-16 dephosphoryliert wird und in den Zellkern wandert. Weiterhin führen Stressfaktoren, wie Hunger, Hitze und oxidativer Stress zu der Translokation von DAF-16 aus dem Zellplasma in den Zellkern [Henderson und Johnson 2001, Lin *et al.* 2001]. Dabei kann DAF-16 infolge einer Nahrungsrestriktion durch die AMPK/AAK-2 [Greer *et al.* 2007] aktiviert werden oder auch bei der oxidativen Stressantwort in Abhängigkeit der p38 MAPK/PMK-1 in den Zellkern translozieren [Kondo *et al.* 2005]. Nachfolgend verstärkt DAF-16, ähnlich wie SKN-1, die Expression von antioxidativ wirkenden Genen, wie z. B. der Katalase, Superoxiddismutase und Glutathion-S-Transferase [Honda und Honda 1999, Murphy *et al.* 2003, Partridge und Bruning 2008]. Durch die Hemmung von DAF-16 durch Kinasen des Insulin/IGF-1 Signalweges wird hingegen dessen Akkumulation in den Zellkern blockiert und die Stressresistenz verringert [Lin *et al.* 2001, Mukhopadhyay *et al.* 2006].

Bei der Lebensspannenanalyse von DAF-16 defizienten Nematoden zeigte sich in Anwesenheit von GlcN eine signifikante Verlängerung der Lebensspanne, wenngleich der lebensverlängernde Effekt im Vergleich zu Wildtyp-Nematoden reduziert war. Daher scheint DAF-16 bei der GlcN-vermittelten Lebensverlängerung eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Eine Behandlung mit Ritalin konnte hingegen keine Steigerung der Lebensspanne in *daf-16* Mutanten hervorrufen, was auf eine Involvierung von DAF-16 in der Ritalin-vermittelten

Lebensverlängerung schließen lässt. Dementsprechend zeigten Geer und Brunet, dass die Aktivierung von DAF-16 bei der Langlebigkeit infolge einer Nahrungsrestriktion notwendig ist [Greer und Brunet 2009]. DAF-16 könnte infolge der gehemmten Nahrungsaufnahme und des entstandenen ROS-Anstiegs bzw. durch die p38 MAPK in Ritalin-behandelten Nematoden verstärkt aktiviert worden sein und zu der nachfolgenden Erhöhung der antioxidativen Enzymaktivitäten sowie Stressresistenz geführt haben.

Eine der meist erforschten Wirkungen von Ritalin ist seine Hemmung des Dopaminwiederaufnahmetransporters [Dougherty *et al.* 1999, Volkow *et al.* 1999, Volkow *et al.* 1998, Volz 2008]. Daher wurde auch in dieser Arbeit der Einfluss des Dopamin-Stoffwechsels bei der Ritalin-vermittelten Lebensverlängerung untersucht.

Hermaphroditen besitzen acht dopaminerge Neuronen [Sulston *et al.* 1975], d. h. zwei ADEs (*anterior deirid neurons*), zwei PDEs (*posterior deirid neurons*) und vier CEPs (*cephalic neurons*). In Anwesenheit von Bakterien wird Dopamin durch diese mechanosensorischen Nervenzellen verstärkt freigesetzt und bindet bzw. aktiviert die Dopaminrezeptoren (D1- und D2-Rezeptoren) [Chase *et al.* 2004, Suo *et al.* 2002, 2003].

Zunächst wurde eine Lebensspannenanalyse von *cat-2* Mutanten durchgeführt, die aufgrund eines Knockouts in der Tyrosinhydroxylase kein Dopamin bilden können. Die Anwesenheit von Ritalin verlängerte in diesem Fall nicht die Lebenserwartung der Nematoden. Auch in den *dat-1* Mutanten, welche keine Dopamintransporter besitzen, und in Dopaminrezeptormutanten (*dop-1*, *dop-2*, *dop-3*) zeigte sich keine Lebensverlängerung infolge der Ritalin-Exposition. Aufgrund dieser Erkenntnisse muss der Neurotransmitter Dopamin bei der Ritalin-vermittelten Lebensverlängerung mit involviert sein.

Dopamin hat, wie Ritalin, einen wichtigen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme. Verschiedene Studien wiesen eine erhöhte Dopaminkonzentration im lateralen Hypothalamus nach der Nahrungszufuhr und eine Hemmung der Nahrungsaufnahme durch eine Verabreichung von Dopamin nach [Leibowitz und Brown 1980, Leibowitz und Rossakis 1978, 1979a, 1979b, Meguid *et al.* 1995, Yang *et al.* 1996]. Eine Hemmung des hypothalamischen Neuropeptids Y (NPY) [Gillard *et al.* 1993] und eine Stimulation des Proopiomelanocortins (POMC) [Tong und Pelletier 1992] könnte hierbei die Verringerung der Nahrungszufuhr durch Dopamin erklären. Auch beim Menschen beeinflusst Dopamin das Essverhalten und spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Adipositas [Wang *et al.* 2002].

Demzufolge wurde zunächst die Aufnahme der *E. coli* Bakterien in *C. elegans* unter Dopamin-Einwirkung untersucht. Hierbei konnte eine signifikante Reduktion der

aufgenommenen Nahrung durch eine zweitägige Dopamin-Behandlung festgestellt werden. Eine gleichzeitige Gabe von Dopamin und Ritalin, welche die extrazelluläre Dopaminkonzentration erhöht, konnte die Hemmung der Nahrungsaufnahme allerdings nicht verstärken. Dies konnte aber in Ratten durch die Gabe des Dopaminaufnahmehemmers Benztropin beobachtet werden [Leibowitz und Rossakis 1978]. Möglicherweise war die hier verwendete Untersuchungsmethode zur Bestimmung der Bakterienaufnahme in *C. elegans* in diesem Fall limitiert. Des Weiteren wurde eine stark reduzierte Nahrungsaufnahme in *dat-1* Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Nematoden festgestellt, welche auf die erhöhten endogenen Dopaminlevels in den *dat-1* Mutanten zurückzuführen sein könnte [Benedetto *et al.* 2010]. Da Ritalin den Dopamintransporter hemmt und somit das postsynaptische Dopaminsignal verstärkt, könnte dies auch die zuvor gezeigte Hemmung der Nahrungszufuhr in Ritalin-behandelten Nematoden erklären.

Zudem wäre es denkbar, dass die verringerte Bakterienaufnahme durch eine Dopamin-Inkubation die Senkung des ATP-Gehaltes in den Dopamin-behandelten Nematoden bewirkte. Der ATP-Abfall könnte aber auch auf die mehrfach belegte Hemmung von Komplex-1 der Atmungskette infolge einer Dopamin-Exposition zurückzuführen sein [Ben-Shachar *et al.* 2004, Chan *et al.* 1994, Przedborski *et al.* 1993].

Außerdem wäre es denkbar, dass die beobachtete Nahrungsrestriktion zu der signifikanten Verlängerung der Lebenserwartung in den Dopamin-behandelten Nematoden geführt hat. So könnte, ähnlich wie bei Ritalin, der mitochondriale Stoffwechsel stimuliert worden sein, was auch den Ausgleich des ATP-Gehaltes nach fünftägiger Dopamin-Inkubation erklären könnte. Des Weiteren kann Dopamin durch die Bildung reaktiver Quinone und Metabolisierung durch die Monoamin-Oxidase (MAO) oxidativen Stress hervorrufen [Graham 1978, Hastings 1995, Maker *et al.* 1981]. Eine nachfolgende Adaption könnte die beobachtete Erhöhung der Stressresistenz in den Dopamin-vorbehandelten Nematoden hervorgerufen haben. Jedoch besteht noch viel Forschungsbedarf, um die Mechanismen bei der Steigerung der Lebensspanne in *C. elegans* durch eine Dopamin-Behandlung zu ergründen.

Die Lebensverlängerung konnte, wie auch die Verringerung der Nahrungsaufnahme, durch die zeitgleiche Gabe von Dopamin und Ritalin nicht weiter verstärkt werden. Somit wirkten diese beiden Substanzen hier nicht synergistisch. Allerdings zeigten die Untersuchungen, dass der Neurotransmitter Dopamin und die Verfügbarkeit seiner Transporter und Rezeptoren in der Ritalin-vermittelten Lebensverlängerung mit involviert sein müssen.

Schlussfolgerungen und Ausblick

Die beiden pharmakologischen Substanzen GlcN und Ritalin konnten als Kalorienrestriktionsmimetika dargestellt werden, die zudem die Lebenserwartung von *C. elegans* verlängerten. Eine Inkubation mit GlcN führte durch Hemmung des Glukosetransports und der Glykolyse zur Beeinträchtigung des Glukosestoffwechsels. Eine Behandlung mit Ritalin bewirkte eine Reduktion der Nahrungsaufnahme, welche möglicherweise durch die Hemmung des Dopaminwiederaufnahmetransporters und dem somit verstärkten postsynaptischen Dopamin-Signal hervorgerufen wurde. Durch die Exposition beider Substanzen resultierte schließlich ein Energiedefizit, welches durch Aktivierung der AMPK zur Induktion der Mitochondrien führte, um den Energiemangel zu kompensieren. Die Steigerung des mitochondrialen Stoffwechsels hatte somit die transiente ROS-Bildung zur Folge, welche nachfolgend endogene Stressabwehrmechanismen aktivierte. Diese verstärkte Stressresistenz führte nach längerer Inkubation zu einer Senkung des ROS-Spiegels und zur Verbesserung der Lebenserwartung. Dabei war die Lebensverlängerung von der initial gesteigerten ROS-Bildung abhängig, da eine Verabreichung von Antioxidantien diesen Effekt aufhebe (Abbildung 70).

Diese Erkenntnisse stehen im Widerspruch zu Harmans „*Free Radical Theory of Ageing*“, in der die reaktiven Sauerstoffspezies als unerwünschte Nebenprodukte der oxidativen Phosphorylierung angesehen und als Hauptverursacher des Alterns betrachtet werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass reaktive Sauerstoffspezies wichtige Signalmoleküle darstellen, die für das Überleben von Zellen notwendig sind. So wird durch das initial gesteigerte ROS-Signal die Stresskinase p38 MAPK/PMK-1 verstärkt phosphoryliert, welche über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die Expression von antioxidativen Enzymen reguliert. Die stressinduzierbaren Transkriptionsfaktoren NRF2/SKN-1 und FOXO/DAF-16 vermitteln dabei die adaptive Antwort durch erhöhte oxidative Abwehrmechanismen, sodass die Stressabwehr und die Lebenserwartung in *C. elegans* gesteigert werden konnte.

Die hier gewonnenen Resultate bestätigen das Konzept der Mitohormesis, da die Anpassung an die initial gesteigerte mitochondriale ROS-Produktion eine Steigerung der Stressresistenz und Lebenserwartung bewirkte.

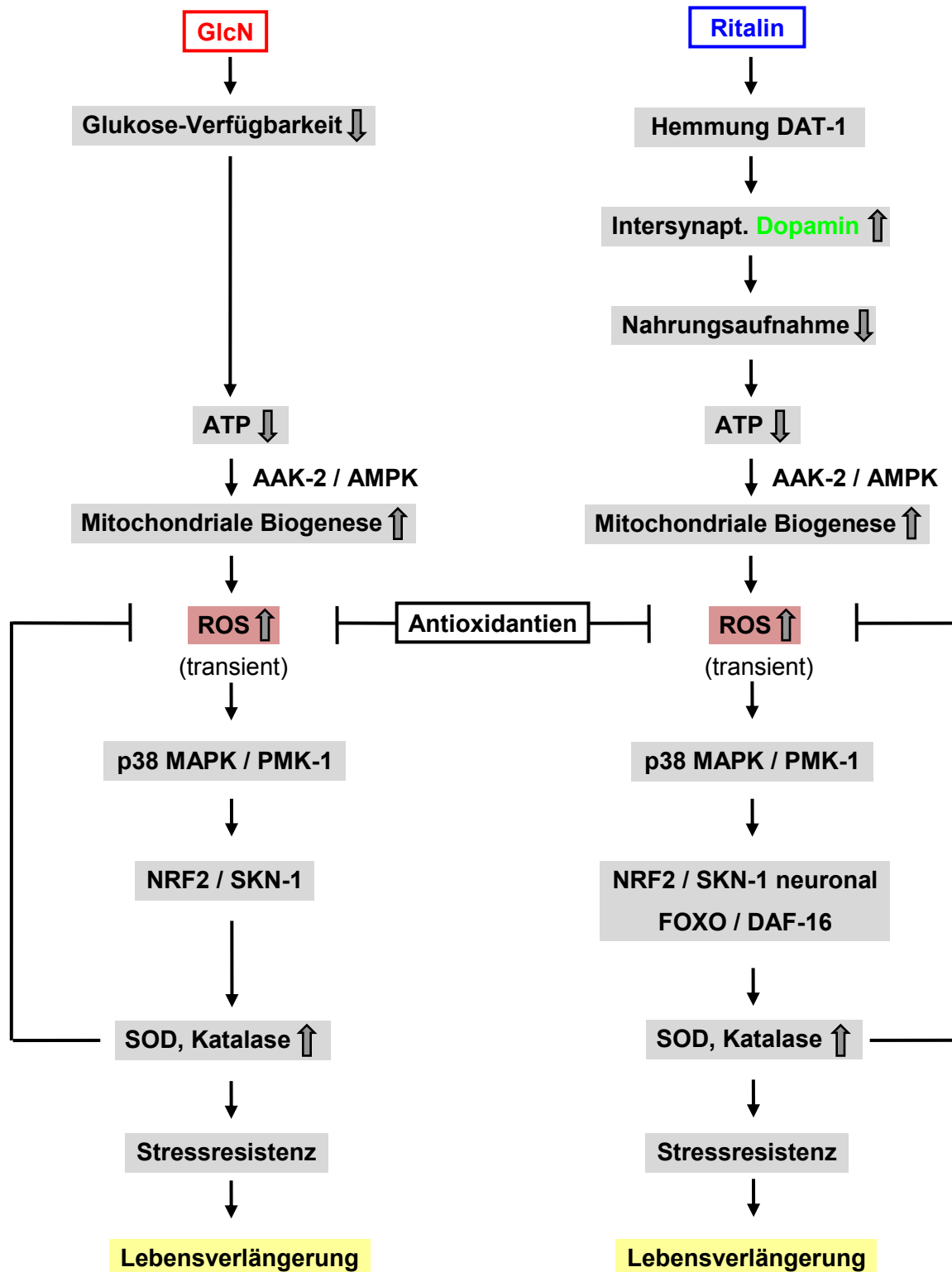


Abbildung 70: Möglicher Wirkmechanismus von GlcN und Ritalin.

Eine GlcN- und Ritalin-Behandlung führte in der vorliegenden Arbeit zu einer signifikanten Lebensverlängerung und zu einer Induktion der Mitochondrien in *C. elegans*. Für den Aminosucker GlcN gibt es bereits Hinweise, dass es ähnliche Wirkungen auch im Mausmodell zur Folge hat (nicht-veröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Ristow). So wurde die Zitratsynthaseaktivität, ein Marker der mitochondrialen Biosynthese, durch eine GlcN-Verabreichung in ob/ob-Mäusen erhöht. Weiterhin konnten durch GlcN verschiedene metabolische Lebensparameter in den ob/ob-Mäusen verbessert werden. GlcN-behandelte Mäuse besaßen eine verbesserte Insulinsensitivität, eine Reduktion der Lebertriglyceride, des Gesamtcholesterins und des LDL-Cholesterins, sodass dem Aminosucker GlcN gesundheitsfördernde Effekte zugesprochen werden können. Interessanterweise gibt es sogar Hinweise, dass eine GlcN-Behandlung, im Gegensatz zu DOG, die Lebensdauer von C57BL/6-Mäusen erhöhen kann (fortlaufende Experimente der Arbeitsgruppe Ristow). So wäre es denkbar, dass eine Supplementierung mit GlcN auch positive Wirkungen auf die Lebenserwartung im Menschen hervorruft. Da GlcN bereits im Menschen als Nahrungsergänzungsmittel sowie als Medikament gegen Osteoarthritis eingesetzt wird und in der Literatur keine negativen Nebenwirkungen beschrieben werden, sollten in weiterführenden Experimenten die Auswirkungen von GlcN auf bestimmte Stoffwechselparameter im Menschen getestet werden. Interessant wären dabei z. B. Untersuchungen zum Sauerstoffverbrauch und zur Leistungsfähigkeit, welche auf eine Induzierung der Mitochondrien zurückzuführen sind.

Außerdem sind weiterführende Experimente zur GlcN-induzierten Hemmung der Paralyse in *C. elegans* erforderlich. Es könnte hierbei untersucht werden, ob GlcN verstärkt Chaperone induziert. Chaperone oder Hitzeschockproteine (HSPs) werden u. a. vermehrt bei Hitzestress gebildet, um eine Fehlfaltung von Proteinen und deren Aggregation zu unterbinden. Bei Nahrungsrestriktion werden vermehrt Hitzeschockfaktoren (HSFs) aktiviert, die zur erhöhten Thermotoleranz sowie zur verlängerten Lebenserwartung führen [Steinkraus *et al.* 2008]. Da der Transkriptionsfaktor HSF-1 den Gehalt an missgefalteten Proteinen reduziert, ist er auch für die Hemmung der Paralyse in *C. elegans* während einer Bakterienrestriktion verantwortlich [Steinkraus *et al.* 2008]. Um die Involvierung von *hsf-1* bei der GlcN-vermittelten Lebensverlängerung zu überprüfen, könnten Lebenszeitanalysen mit *hsf-1* Mutanten in An- und Abwesenheit von GlcN durchgeführt werden.

Für Ritalin gibt es bisher keine publizierten Studien zur Lebenserwartung. Demnach könnte in nachfolgenden Experimenten eine Lebenszeitanalyse in Mäusen oder Ratten durchgeführt werden. Dabei wäre auch eine Messung der Körpermasse und -zusammensetzung sinnvoll. Des Weiteren würde sich eine Bestimmung der Zitratsynthase

in der Leber anbieten, um Erkenntnisse zur mitochondrialen Biogenese zu erlangen. Außerdem könnte die Bewegungsaktivität der Tiere als wichtiger Lebensparameter ermittelt werden. Untersuchungen beim Menschen gestalten sich allerdings problematisch, da Ritalin dem Betäubungsmittelgesetz unterliegt und Suchtpotential besitzt.

Ein großer Forschungsbedarf besteht bei der Involvierung des Neurotransmitters Dopamin in der Ritalin-vermittelten Lebensverlängerung. Es wäre zu erforschen, ob die Hemmung des Dopamintransporters und das dadurch verstärkte postsynaptische Dopaminsignal ursächlich für die Ritalin-vermittelte Hemmung der Nahrungszufuhr sind. Dazu könnte als initiales Experiment die Nahrungsaufnahme von *cat-2* und/oder *dat-1* Mutanten in An- und Abwesenheit von Ritalin gemessen werden.

Weiterhin sollten die grundlegenden Mechanismen zur Dopamin-vermittelten Lebensverlängerung analysiert werden. Dabei könnte auch eine mögliche Komplex-1-Hemmung untersucht werden. Angebracht wäre ebenfalls die Messung der ROS-Spiegel und antioxidativen Enzymaktivitäten nach unterschiedlichen Zeitpunkten, um die beobachtete Steigerung der oxidativen Stressresistenz erklären zu können.

Für alle drei Substanzen - GlcN, Ritalin und Dopamin - gilt es weitere Signalwege und beteiligte Gene zu erforschen, die bei der Steigerung der Lebensdauer beteiligt sind. Dies ist durch den Einsatz von verschiedenen Mutantenstämmen und RNA-Interferenz möglich.

Literaturverzeichnis

- Agarwal, S. et al., 2005.** *Caloric restriction augments ROS defense in S. cerevisiae by a Sir2p independent mechanism.* Free Radic Res, 39 (1): 55-62.
- Aiassa, V. et al., 2012.** *In vitro oxidant effects of D-glucosamine reduce adhesion and biofilm formation of Staphylococcus epidermidis.* Rev Argent Microbiol, 44 (1): 16-20.
- Alam, Z. I. et al., 1997a.** *A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease.* J Neurochem, 69 (3): 1326-1329.
- Alam, Z. I. et al., 1997b.** *Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra.* J Neurochem, 69 (3): 1196-1203.
- Albanes, D. et al., 1996.** *Alpha-Tocopherol and beta-carotene supplements and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study: effects of base-line characteristics and study compliance.* J Natl Cancer Inst, 88 (21): 1560-1570.
- Alburges, M. E. et al., 2011.** *Methylphenidate alters basal ganglia neurotensin systems through dopaminergic mechanisms: a comparison with cocaine treatment.* J Neurochem, 117 (3): 470-478.
- Alexeyev, M. F., 2009.** *Is there more to aging than mitochondrial DNA and reactive oxygen species?* FEBS J, 276 (20): 5768-5787.
- Altun, Z. F. und D. H. Hall, 2012.** *Handbook of C. elegans Anatomy.* WormAtlas, <http://wormatlas.org>
- An, J. H. und T. K. Blackwell, 2003.** *SKN-1 links C. elegans mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response.* Genes Dev, 17 (15): 1882-1893.
- An, J. H. et al., 2005.** *Regulation of the Caenorhabditis elegans oxidative stress defense protein SKN-1 by glycogen synthase kinase-3.* Proc Natl Acad Sci U S A, 102 (45): 16275-16280.
- Anderson, J. W. et al., 2005.** *Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy.* Food Chem Toxicol, 43 (2): 187-201.
- Andersson, U. et al., 2004.** *AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake.* J Biol Chem, 279 (13): 12005-12008.
- Apfeld, J. et al., 2004.** *The AMP-activated protein kinase aak-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in C. elegans.* Genes Dev, 18 (24): 3004-3009.
- Arlt, A. et al., 2009.** *Increased proteasome subunit protein expression and proteasome activity in colon cancer relate to an enhanced activation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2).* Oncogene, 28 (45): 3983-3996.
- Auriel, E. et al., 2009.** *Methylphenidate for the treatment of Parkinson disease and other neurological disorders.* Clin Neuropharmacol, 32 (2): 75-81.
- Avery, L., 1993.** *The genetics of feeding in Caenorhabditis elegans.* Genetics, 133 (4): 897-917.
- Balkan, B. und B. E. Dunning, 1994.** *Glucosamine inhibits glucokinase in vitro and produces a glucose-specific impairment of in vivo insulin secretion in rats.* Diabetes, 43 (10): 1173-1179.

- Barja, G., 1993.** *Oxygen radicals, a failure or a success of evolution?* Free Radic Res Commun, 18 (2): 63-70.
- Barnes, K. et al., 2002.** *Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK).* J Cell Sci, 115 (Pt 11): 2433-2442.
- Baron, A. D. et al., 1995.** *Glucosamine induces insulin resistance in vivo by affecting GLUT 4 translocation in skeletal muscle. Implications for glucose toxicity.* J Clin Invest, 96 (6): 2792-2801.
- Barrientos, C. et al., 2010.** *Glucosamine attenuates increases of intraabdominal fat, serum leptin levels, and insulin resistance induced by a high-fat diet in rats.* Nutr Res, 30 (11): 791-800.
- Barros, M. H. et al., 2004.** *Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in Saccharomyces cerevisiae.* J Biol Chem, 279 (48): 49883-49888.
- Barzilai, N. et al., 1996.** *Glucosamine-induced inhibition of liver glucokinase impairs the ability of hyperglycemia to suppress endogenous glucose production.* Diabetes, 45 (10): 1329-1335.
- Bassleer, C. et al., 1992.** *In-vitro evaluation of drugs proposed as chondroprotective agents.* Int J Tissue React, 14 (5): 231-241.
- Bassleer, C. et al., 1998.** *Stimulation of proteoglycan production by glucosamine sulfate in chondrocytes isolated from human osteoarthritic articular cartilage in vitro.* Osteoarthritis Cartilage, 6 (6): 427-434.
- Bello, N. T. und A. Hajnal, 2006.** *Acute methylphenidate treatments reduce sucrose intake in restricted-fed bingeing rats.* Brain Res Bull, 70 (4-6): 422-429.
- Ben-Shachar, D. et al., 2004.** *Dopamine toxicity involves mitochondrial complex I inhibition: implications to dopamine-related neuropsychiatric disorders.* Biochem Pharmacol, 67 (10): 1965-1974.
- Benedetto, A. et al., 2010.** *Extracellular dopamine potentiates mn-induced oxidative stress, lifespan reduction, and dopaminergic neurodegeneration in a BLI-3-dependent manner in Caenorhabditis elegans.* PLoS Genet, 6 (8):
- Biederman, J. und S. V. Faraone, 2005.** *Attention-deficit hyperactivity disorder.* Lancet, 366 (9481): 237-248.
- Bishop, N. A. und L. Guarente, 2007a.** *Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans.* Nat Rev Genet, 8 (11): 835-844.
- Bishop, N. A. und L. Guarente, 2007b.** *Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in C. elegans.* Nature, 447 (7144): 545-549.
- Bjelakovic, G. et al., 2007.** *Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis.* JAMA, 297 (8): 842-857.
- Blurton-Jones, M. und F. M. Laferla, 2006.** *Pathways by which Abeta facilitates tau pathology.* Curr Alzheimer Res, 3 (5): 437-448.
- Bonawitz, N. D. et al., 2007.** *Reduced TOR signaling extends chronological life span via increased respiration and upregulation of mitochondrial gene expression.* Cell Metab, 5 (4): 265-277.
- Bonneh-Barkay, D. et al., 2005.** *Redox cycling of the herbicide paraquat in microglial cultures.* Brain Res Mol Brain Res, 134 (1): 52-56.

- Boutten, A. et al., 2011.** *NRF2 targeting: a promising therapeutic strategy in chronic obstructive pulmonary disease.* Trends Mol Med, 17 (7): 363-371.
- Boveris, A. und B. Chance, 1973.** *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen.* Biochem J, 134 (3): 707-716.
- Bradford, M. M., 1976.** *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem, 72 248-254.
- Brenner, S., 1974.** *The genetics of Caenorhabditis elegans.* Genetics, 77 (1): 71-94.
- Bymaster, F. P. et al., 2002.** *Atomoxetine increases extracellular levels of norepinephrine and dopamine in prefrontal cortex of rat: a potential mechanism for efficacy in attention deficit/hyperactivity disorder.* Neuropsychopharmacology, 27 (5): 699-711.
- Calabrese, V. et al., 2011.** *Hormesis, cellular stress response and vitagenes as critical determinants in aging and longevity.* Mol Aspects Med, 32 (4-6): 279-304.
- Camacho, A. und B. Ng, 2006.** *Methylphenidate for alpha-interferon induced depression.* J Psychopharmacol, 20 (5): 687-689.
- Challman, T. D. und J. J. Lipsky, 2000.** *Methylphenidate: its pharmacology and uses.* Mayo Clin Proc, 75 (7): 711-721.
- Chan, P. et al., 1994.** *Rapid ATP loss caused by methamphetamine in the mouse striatum: relationship between energy impairment and dopaminergic neurotoxicity.* J Neurochem, 62 (6): 2484-2487.
- Chan, P. S. et al., 2005.** *Effect of glucosamine and chondroitin sulfate on regulation of gene expression of proteolytic enzymes and their inhibitors in interleukin-1-challenged bovine articular cartilage explants.* Am J Vet Res, 66 (11): 1870-1876.
- Chance, B. et al., 1979.** *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.* Physiol Rev, 59 (3): 527-605.
- Chandel, N. S. und G. R. Budinger, 2007.** *The cellular basis for diverse responses to oxygen.* Free Radic Biol Med, 42 (2): 165-174.
- Chang, L. und M. Karin, 2001.** *Mammalian MAP kinase signalling cascades.* Nature, 410 (6824): 37-40.
- Chase, D. L. et al., 2004.** *Mechanism of extrasynaptic dopamine signaling in Caenorhabditis elegans.* Nat Neurosci, 7 (10): 1096-1103.
- Chen, P. C. et al., 2009.** *Nrf2-mediated neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: Critical role for the astrocyte.* Proc Natl Acad Sci U S A, 106 (8): 2933-2938.
- Chen, S. et al., 2008.** *Complementary regulation of TBC1D1 and AS160 by growth factors, insulin and AMPK activators.* Biochem J, 409 (2): 449-459.
- Cheon, K. A. et al., 2003.** *Dopamine transporter density in the basal ganglia assessed with [123I]IPT SPET in children with attention deficit hyperactivity disorder.* Eur J Nucl Med Mol Imaging, 30 (2): 306-311.
- Chevion, S. et al., 2003.** *Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise.* Proc Natl Acad Sci U S A, 100 (9): 5119-5123.

- Chiusaroli, R. et al., 2011.** *Experimental pharmacology of glucosamine sulfate*. Int J Rheumatol, 2011 939265.
- Citron, M. et al., 1992.** *Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production*. Nature, 360 (6405): 672-674.
- Cohen, G., 1994.** *Enzymatic/nonenzymatic sources of oxyradicals and regulation of antioxidant defenses*. Ann N Y Acad Sci, 738 8-14.
- Colman, R. J. et al., 2009.** *Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys*. Science, 325 (5937): 201-204.
- Connor, K. M. et al., 2005.** *Mitochondrial H₂O₂ regulates the angiogenic phenotype via PTEN oxidation*. J Biol Chem, 280 (17): 16916-16924.
- Consortium, T. C. e. S., 1998.** *Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology*. Science, 282 (5396): 2012-2018.
- Cook, N. R. et al., 2007.** *A randomized factorial trial of vitamins C and E and beta carotene in the secondary prevention of cardiovascular events in women: results from the Women's Antioxidant Cardiovascular Study*. Arch Intern Med, 167 (15): 1610-1618.
- Cooper, N. J. et al., 2005.** *The dose-dependent effect of methylphenidate on performance, cognition and psychophysiology*. J Integr Neurosci, 4 (1): 123-144.
- Corbisier, P. und J. Remacle, 1990.** *Involvement of mitochondria in cell degeneration*. Eur J Cell Biol, 51 (1): 173-182.
- Coyle, J. T. und P. Puttfarcken, 1993.** *Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders*. Science, 262 (5134): 689-695.
- Cypser, J. R. und T. E. Johnson, 2002.** *Multiple stressors in Caenorhabditis elegans induce stress hormesis and extended longevity*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 57 (3): B109-114.
- Czernichow, S. et al., 2005.** *Effect of supplementation with antioxidants upon long-term risk of hypertension in the SU.VI.MAX study: association with plasma antioxidant levels*. J Hypertens, 23 (11): 2013-2018.
- Czernichow, S. et al., 2006.** *Antioxidant supplementation does not affect fasting plasma glucose in the Supplementation with Antioxidant Vitamins and Minerals (SU.VI.MAX) study in France: association with dietary intake and plasma concentrations*. Am J Clin Nutr, 84 (2): 395-399.
- Davies, K. J. et al., 1982.** *Free radicals and tissue damage produced by exercise*. Biochem Biophys Res Commun, 107 (4): 1198-1205.
- Davis, C. et al., 2012.** *The suppression of appetite and food consumption by methylphenidate: the moderating effects of gender and weight status in healthy adults*. Int J Neuropsychopharmacol, 15 (2): 181-187.
- de Bono, M. und A. V. Maricq, 2005.** *Neuronal substrates of complex behaviors in C. elegans*. Annu Rev Neurosci, 28 451-501.
- Dean, R. L., 3rd et al., 1981.** *Age-related differences in behavior across the life span of the C57BL/6J mouse*. Exp Aging Res, 7 (4): 427-451.

- Deng, Y. et al., 2009.** *Dysregulation of insulin signaling, glucose transporters, O-GlcNAcylation, and phosphorylation of tau and neurofilaments in the brain: Implication for Alzheimer's disease.* Am J Pathol, 175 (5): 2089-2098.
- Denny, C. A. et al., 2006.** *Influence of caloric restriction on motor behavior, longevity, and brain lipid composition in Sandhoff disease mice.* J Neurosci Res, 83 (6): 1028-1038.
- Devos, D. et al., 2007.** *Improvement of gait by chronic, high doses of methylphenidate in patients with advanced Parkinson's disease.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 78 (5): 470-475.
- Dillemans, M. et al., 2008.** *Yeast as a model system for identification of metabolic targets of a 'glucosamine complex' used as a therapeutic agent of osteoarthritis.* Biomed Pharmacother, 62 (9): 645-650.
- Dilova, I. et al., 2007.** *Calorie restriction and the nutrient sensing signaling pathways.* Cell Mol Life Sci, 64 (6): 752-767.
- Diomedea, L. et al., 2010.** *Tetracycline and its analogues protect Caenorhabditis elegans from beta amyloid-induced toxicity by targeting oligomers.* Neurobiol Dis, 40 (2): 424-431.
- Doonan, R. et al., 2008.** *Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in Caenorhabditis elegans.* Genes Dev, 22 (23): 3236-3241.
- Dostal, V. und C. D. Link, 2010.** *Assaying β -amyloid Toxicity using a Transgenic C. elegans Model.* J Vis Exp, (44): e2252.
- Dostal, V. et al., 2010.** *Genetic mechanisms of coffee extract protection in a Caenorhabditis elegans model of beta-amyloid peptide toxicity.* Genetics, 186 (3): 857-866.
- Dougherty, D. D. et al., 1999.** *Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder.* Lancet, 354 (9196): 2132-2133.
- Dröge, W., 2002.** *Free radicals in the physiological control of cell function.* Physiol Rev, 82 (1): 47-95.
- Elfers, C. T. und C. L. Roth, 2011.** *Effects of methylphenidate on weight gain and food intake in hypothalamic obesity.* Front Endocrinol (Lausanne), 2 78.
- Fagundes, A. O. et al., 2010a.** *Effect of acute and chronic administration of methylphenidate on mitochondrial respiratory chain in the brain of young rats.* Neurochem Res, 35 (11): 1675-1680.
- Fagundes, A. O. et al., 2010b.** *Inhibition of mitochondrial respiratory chain in the brain of adult rats after acute and chronic administration of methylphenidate.* Neurochem Res, 35 (3): 405-411.
- Finley, L. W. und M. C. Haigis, 2009.** *The coordination of nuclear and mitochondrial communication during aging and calorie restriction.* Ageing Res Rev, 8 (3): 173-188.
- Fisch, R. Z., 1985.** *Methylphenidate for medical in-patients.* Int J Psychiatry Med, 15 (1): 75-79.
- Fischer, J. C. et al., 1986.** *Estimation of NADH oxidation in human skeletal muscle mitochondria.* Clin Chim Acta, 155 (3): 263-273.
- Fontana, L. et al., 2010a.** *Effects of long-term calorie restriction and endurance exercise on glucose tolerance, insulin action, and adipokine production.* Age (Dordr), 32 (1): 97-108.

- Fontana, L. et al., 2004.** *Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans.* Proc Natl Acad Sci U S A, 101 (17): 6659-6663.
- Fontana, L. et al., 2010b.** *Extending healthy life span--from yeast to humans.* Science, 328 (5976): 321-326.
- Fontana, L. et al., 2007.** *Calorie restriction or exercise: effects on coronary heart disease risk factors. A randomized, controlled trial.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 293 (1): E197-202.
- Fostel, J. L. et al., 2003.** *Degradation of transgene-coded and endogenous proteins in the muscles of Caenorhabditis elegans.* Biochem Biophys Res Commun, 312 (1): 173-177.
- Fregly, M. J. und B. A. Black, 1964.** *Effect of Methylphenidate on Spontaneous Activity, Food Intake, and Cold Tolerance of Propylthiouracil-Treated Rats.* Can J Physiol Pharmacol, 42 415-429.
- Fridovich, I., 1978.** *The biology of oxygen radicals.* Science, 201 (4359): 875-880.
- Fujii, M. et al., 1998.** *A novel superoxide dismutase gene encoding membrane-bound and extracellular isoforms by alternative splicing in Caenorhabditis elegans.* DNA Res, 5 (1): 25-30.
- Gems, D. und R. Doonan, 2009.** *Antioxidant defense and aging in C. elegans: is the oxidative damage theory of aging wrong?* Cell Cycle, 8 (11): 1681-1687.
- Gems, D. und L. Partridge, 2008.** *Stress-response hormesis and aging: "that which does not kill us makes us stronger".* Cell Metab, 7 (3): 200-203.
- Giglio, M. P. et al., 1994.** *The manganese superoxide dismutase gene of Caenorhabditis elegans.* Biochem Mol Biol Int, 33 (1): 37-40.
- Gillard, E. R. et al., 1993.** *Evidence that neuropeptide Y and dopamine in the perifornical hypothalamus interact antagonistically in the control of food intake.* Brain Res, 628 (1-2): 128-136.
- Goforth, H. W. et al., 2004.** *Quantitative electroencephalography in frontotemporal dementia with methylphenidate response: a case study.* Clin EEG Neurosci, 35 (2): 108-111.
- Goldfield, G. S. et al., 2007.** *Methylphenidate reduces energy intake and dietary fat intake in adults: a mechanism of reduced reinforcing value of food?* Am J Clin Nutr, 86 (2): 308-315.
- Gomes, K. M. et al., 2009.** *Superoxide production after acute and chronic treatment with methylphenidate in young and adult rats.* Neurosci Lett, 465 (1): 95-98.
- Gomes, K. M. et al., 2008.** *Antioxidant enzyme activities following acute or chronic methylphenidate treatment in young rats.* Neurochem Res, 33 (6): 1024-1027.
- Gomez-Cabrera, M. C. et al., 2008.** *Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance.* Am J Clin Nutr, 87 (1): 142-149.
- Goodrick, C. L. et al., 1990.** *Effects of intermittent feeding upon body weight and lifespan in inbred mice: interaction of genotype and age.* Mech Ageing Dev, 55 (1): 69-87.
- Graham, D. G., 1978.** *Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones.* Mol Pharmacol, 14 (4): 633-643.
- Grandison, R. C. et al., 2009.** *Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in Drosophila.* Nature, 462 (7276): 1061-1064.

- Greenberg, E. R. et al., 1994.** *A clinical trial of antioxidant vitamins to prevent colorectal adenoma. Polyp Prevention Study Group.* N Engl J Med, 331 (3): 141-147.
- Greer, E. L. und A. Brunet, 2009.** *Different dietary restriction regimens extend lifespan by both independent and overlapping genetic pathways in C. elegans.* Aging Cell, 8 (2): 113-127.
- Greer, E. L. et al., 2007.** *An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in C. elegans.* Curr Biol, 17 (19): 1646-1656.
- Grundke-Iqbal, I. et al., 1986.** *Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology.* Proc Natl Acad Sci U S A, 83 (13): 4913-4917.
- Guzy, R. D. et al., 2005.** *Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing.* Cell Metab, 1 (6): 401-408.
- Guzy, R. D. und P. T. Schumacker, 2006.** *Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia.* Exp Physiol, 91 (5): 807-819.
- Han, D. et al., 2003.** *Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol.* J Biol Chem, 278 (8): 5557-5563.
- Hardie, D. G., 2007.** *AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy.* Nat Rev Mol Cell Biol, 8 (10): 774-785.
- Hardie, D. G., 2011.** *AMP-activated protein kinase--an energy sensor that regulates all aspects of cell function.* Genes Dev, 25 (18): 1895-1908.
- Harman, D., 1956.** *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.* J Gerontol, 11 (3): 298-300.
- Harman, D., 1972.** *The biologic clock: the mitochondria?* J Am Geriatr Soc, 20 (4): 145-147.
- Hart, G. W. et al., 2011.** *Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease.* Annu Rev Biochem, 80 825-858.
- Hartwig, K. et al., 2009.** *Feeding a ROS-generator to Caenorhabditis elegans leads to increased expression of small heat shock protein HSP-16.2 and hormesis.* Genes Nutr, 4 (1): 59-67.
- Hastings, T. G., 1995.** *Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase.* J Neurochem, 64 (2): 919-924.
- Hawkins, M. et al., 1996.** *Increased hexosamine availability similarly impairs the action of insulin and IGF-1 on glucose disposal.* Diabetes, 45 (12): 1734-1743.
- Heilbronn, L. K. et al., 2006.** *Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial.* JAMA, 295 (13): 1539-1548.
- Henderson, S. T. und T. E. Johnson, 2001.** *daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode Caenorhabditis elegans.* Curr Biol, 11 (24): 1975-1980.
- Herrmann, N. et al., 2008.** *Methylphenidate for the treatment of apathy in Alzheimer disease: prediction of response using dextroamphetamine challenge.* J Clin Psychopharmacol, 28 (3): 296-301.

- Higuchi, R. et al., 1993.** *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.* Biotechnology (N Y), 11 (9): 1026-1030.
- Hodgkin, J. et al., 1979.** *Nondisjunction Mutants of the Nematode CAENORHABDITIS ELEGANS.* Genetics, 91 (1): 67-94.
- Holmes, B. F. et al., 1999.** *Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle.* J Appl Physiol, 87 (5): 1990-1995.
- Holt, S. J. und D. L. Riddle, 2003.** *SAGE surveys C. elegans carbohydrate metabolism: evidence for an anaerobic shift in the long-lived dauer larva.* Mech Ageing Dev, 124 (7): 779-800.
- Holzenberger, M. et al., 2003.** *IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice.* Nature, 421 (6919): 182-187.
- Hommes, D. W. et al., 2003.** *Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets.* Gut, 52 (1): 144-151.
- Honda, Y. und S. Honda, 1999.** *The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in Caenorhabditis elegans.* FASEB J, 13 (11): 1385-1393.
- Hoppe, S. et al., 2009.** *AMP-activated protein kinase adapts rRNA synthesis to cellular energy supply.* Proc Natl Acad Sci U S A, 106 (42): 17781-17786.
- Houthoofd, K. et al., 2003.** *Life extension via dietary restriction is independent of the Ins/IGF-1 signalling pathway in Caenorhabditis elegans.* Exp Gerontol, 38 (9): 947-954.
- Houthoofd, K. et al., 2002.** *Axenic growth up-regulates mass-specific metabolic rate, stress resistance, and extends life span in Caenorhabditis elegans.* Exp Gerontol, 37 (12): 1371-1378.
- Howes, R. M., 2006.** *The free radical fantasy: a panoply of paradoxes.* Ann N Y Acad Sci, 1067 22-26.
- Hresko, R. C. et al., 1998.** *Glucosamine-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is caused by depletion of intracellular ATP.* J Biol Chem, 273 (32): 20658-20668.
- Huang, C. et al., 2004.** *Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of Caenorhabditis elegans.* Proc Natl Acad Sci U S A, 101 (21): 8084-8089.
- Huang, H. C. et al., 2000.** *Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2.* Proc Natl Acad Sci U S A, 97 (23): 12475-12480.
- Hunter, T. et al., 1997.** *Cloning, expression, and characterization of two manganese superoxide dismutases from Caenorhabditis elegans.* J Biol Chem, 272 (45): 28652-28659.
- Hursting, S. D. et al., 2003.** *Calorie restriction, aging, and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans.* Annu Rev Med, 54 131-152.
- Ingram, D. K. et al., 2006.** *The potential for dietary restriction to increase longevity in humans: extrapolation from monkey studies.* Biogerontology, 7 (3): 143-148.
- Inoue, H. et al., 2005.** *The C. elegans p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response.* Genes Dev, 19 (19): 2278-2283.

- Itoh, K. et al., 1999.** *Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain.* Genes Dev, 13 (1): 76-86.
- Jackson, G. R. et al., 2002.** *Human wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in Drosophila.* Neuron, 34 (4): 509-519.
- Jadad, A. R. et al., 1999.** *Treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder.* Evid Rep Technol Assess (Summ), (11): i-viii, 1-341.
- Janssen, A. J. et al., 2007.** *Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts.* Clin Chem, 53 (4): 729-734.
- Jeffery, D. et al., 1984.** *Ethylene-independent and ethylene-dependent biochemical changes in ripening tomatoes.* Plant Physiol, 74 (1): 32-38.
- Jensen, L. T. und V. C. Culotta, 2005.** *Activation of CuZn superoxide dismutases from Caenorhabditis elegans does not require the copper chaperone CCS.* J Biol Chem, 280 (50): 41373-41379.
- Jia, K. und B. Levine, 2007.** *Autophagy is required for dietary restriction-mediated life span extension in C. elegans.* Autophagy, 3 (6): 597-599.
- Johnson, G. L. und R. Lapadat, 2002.** *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases.* Science, 298 (5600): 1911-1912.
- Jorgensen, E. M. und S. E. Mango, 2002.** *The art and design of genetic screens: caenorhabditis elegans.* Nat Rev Genet, 3 (5): 356-369.
- Ju, H. W. et al., 2009.** *Glucosamine causes overproduction of reactive oxygen species, leading to repression of hypocotyl elongation through a hexokinase-mediated mechanism in Arabidopsis.* J Plant Physiol, 166 (2): 203-212.
- Kaeberlein, M. et al., 2005.** *Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients.* Science, 310 (5751): 1193-1196.
- Kaeberlein, T. L. et al., 2006.** *Lifespan extension in Caenorhabditis elegans by complete removal of food.* Aging Cell, 5 (6): 487-494.
- Kaelin, W. G., Jr., 2005.** *ROS: really involved in oxygen sensing.* Cell Metab, 1 (6): 357-358.
- Kaestner, K. H. et al., 2000.** *Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors.* Genes Dev, 14 (2): 142-146.
- Kaletta, T. und M. O. Hengartner, 2006.** *Finding function in novel targets: C. elegans as a model organism.* Nat Rev Drug Discov, 5 (5): 387-398.
- Kanninen, K. et al., 2009.** *Intrahippocampal injection of a lentiviral vector expressing Nrf2 improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer's disease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 106 (38): 16505-16510.
- Kanninen, K. et al., 2008.** *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 protects against beta amyloid.* Mol Cell Neurosci, 39 (3): 302-313.
- Kapahi, P. et al., 2004.** *Regulation of lifespan in Drosophila by modulation of genes in the TOR signaling pathway.* Curr Biol, 14 (10): 885-890.

- Kapeta, S. et al., 2010.** Nuclear erythroid factor 2-mediated proteasome activation delays senescence in human fibroblasts. *J Biol Chem*, 285 (11): 8171-8184.
- Kappeler, L. et al., 2008.** Brain IGF-1 receptors control mammalian growth and lifespan through a neuroendocrine mechanism. *PLoS Biol*, 6 (10): e254.
- Kataja-Tuomola, M. et al., 2008.** Effect of alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation on the incidence of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 51 (1): 47-53.
- Katic, M. et al., 2007.** Mitochondrial gene expression and increased oxidative metabolism: role in increased lifespan of fat-specific insulin receptor knock-out mice. *Aging Cell*, 6 (6): 827-839.
- Katsiki, N. und C. Manes, 2009.** Is there a role for supplemented antioxidants in the prevention of atherosclerosis? *Clin Nutr*, 28 (1): 3-9.
- Kenyon, C., 1988.** The nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 240 (4858): 1448-1453.
- Kenyon, C. et al., 1993.** A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*, 366 (6454): 461-464.
- Kharade, S. V. et al., 2005.** Mrg19 depletion increases *S. cerevisiae* lifespan by augmenting ROS defence. *FEBS Lett*, 579 (30): 6809-6813.
- Kimko, H. C. et al., 1999.** Pharmacokinetics and clinical effectiveness of methylphenidate. *Clin Pharmacokinet*, 37 (6): 457-470.
- Kisilevsky, R. und W. A. Szarek, 2002.** Novel glycosaminoglycan precursors as anti-amyloid agents part II. *J Mol Neurosci*, 19 (1-2): 45-50.
- Klass, M. R., 1977.** Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: major biological and environmental factors influencing life span. *Mech Ageing Dev*, 6 (6): 413-429.
- Knab, A. M. et al., 2012.** Pharmacological manipulation of the dopaminergic system affects wheel-running activity in differentially active mice. *J Biol Regul Homeost Agents*, 26 (1): 119-129.
- Kobayashi, A. et al., 2006.** Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol*, 26 (1): 221-229.
- Kobayashi, M. und M. Yamamoto, 2006.** Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul*, 46 113-140.
- Koizumi, A. et al., 1987.** Influences of dietary restriction and age on liver enzyme activities and lipid peroxidation in mice. *J Nutr*, 117 (2): 361-367.
- Kondo, M. et al., 2005.** The p38 signal transduction pathway participates in the oxidative stress-mediated translocation of DAF-16 to *Caenorhabditis elegans* nuclei. *Mech Ageing Dev*, 126 (6-7): 642-647.
- Koneski, J. A. et al., 2011.** Efficacy and safety of methylphenidate in treating ADHD symptoms in children and adolescents with uncontrolled seizures: a Brazilian sample study and literature review. *Epilepsy Behav*, 21 (3): 228-232.
- Koo, S. H. et al., 2005.** The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature*, 437 (7062): 1109-1111.

- Krause, K. H. et al., 2000.** *Increased striatal dopamine transporter in adult patients with attention deficit hyperactivity disorder: effects of methylphenidate as measured by single photon emission computed tomography.* Neurosci Lett, 285 (2): 107-110.
- Kumsta, C. et al., 2011.** *Effects of oxidative stress on behavior, physiology, and the redox thiol proteome of Caenorhabditis elegans.* Antioxidants & redox signaling, 14 (6): 1023-1037.
- Kurth-Kraczek, E. J. et al., 1999.** *5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle.* Diabetes, 48 (8): 1667-1671.
- Kyriakis, J. M. und J. Avruch, 2001.** *Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation.* Physiol Rev, 81 (2): 807-869.
- Lakowski, B. und S. Hekimi, 1998.** *The genetics of caloric restriction in Caenorhabditis elegans.* Proc Natl Acad Sci U S A, 95 (22): 13091-13096.
- Landis, G. N. und J. Tower, 2005.** *Superoxide dismutase evolution and life span regulation.* Mech Ageing Dev, 126 (3): 365-379.
- Lanza, I. R. et al., 2008.** *Endurance exercise as a countermeasure for aging.* Diabetes, 57 (11): 2933-2942.
- Largo, R. et al., 2003.** *Glucosamine inhibits IL-1beta-induced NFkappaB activation in human osteoarthritic chondrocytes.* Osteoarthritis Cartilage, 11 (4): 290-298.
- Larisch, R. et al., 2006.** *Striatal dopamine transporter density in drug naive patients with attention-deficit/hyperactivity disorder.* Nucl Med Commun, 27 (3): 267-270.
- Larsen, P. L., 1993.** *Aging and resistance to oxidative damage in Caenorhabditis elegans.* Proc Natl Acad Sci U S A, 90 (19): 8905-8909.
- Lavretsky, H. et al., 2006.** *Methylphenidate-enhanced antidepressant response to citalopram in the elderly: a double-blind, placebo-controlled pilot trial.* Am J Geriatr Psychiatry, 14 (2): 181-185.
- Le Bourg, E., 1987.** *The rate of living theory. Spontaneous locomotor activity, aging and longevity in Drosophila melanogaster.* Exp Gerontol, 22 (5): 359-369.
- Le Bourg, E., 2009.** *Hormesis, aging and longevity.* Biochim Biophys Acta, 1790 (10): 1030-1039.
- Le Bourg, E. und D. Fournier, 2004.** *Is lifespan extension accompanied by improved antioxidant defences? A study of superoxide dismutase and catalase in Drosophila melanogaster flies that lived in hypergravity at a young age.* Biogerontology, 5 (4): 261-266.
- Leddy, J. J. et al., 2004.** *Influence of methylphenidate on eating in obese men.* Obes Res, 12 (2): 224-232.
- Lee, G. D. et al., 2006.** *Dietary deprivation extends lifespan in Caenorhabditis elegans.* Aging Cell, 5 (6): 515-524.
- Leibowitz, S. F. und L. L. Brown, 1980.** *Histochemical and pharmacological analysis of catecholaminergic projections to the perifornical hypothalamus in relation to feeding inhibition.* Brain Res, 201 (2): 315-345.
- Leibowitz, S. F. und C. Rossakis, 1978.** *Analysis of feeding suppression produced by perifornical hypothalamic injection of catecholamines, amphetamines and mazindol.* Eur J Pharmacol, 53 (1): 69-81.

- Leibowitz, S. F. und C. Rossakis, 1979a.** *Mapping study of brain dopamine- and epinephrine-sensitive sites which cause feeding suppression in the rat.* Brain Res, 172 (1): 101-113.
- Leibowitz, S. F. und C. Rossakis, 1979b.** *Pharmacological characterization of perifornical hypothalamic dopamine receptors mediating feeding inhibition in the rat.* Brain Res, 172 (1): 115-130.
- Leonard, B. E. et al., 2004.** *Methylphenidate: a review of its neuropharmacological, neuropsychological and adverse clinical effects.* Hum Psychopharmacol, 19 (3): 151-180.
- Levant, B. et al., 2011.** *Differences in methylphenidate dose response between periadolescent and adult rats in the familiar arena-novel alcove task.* J Pharmacol Exp Ther, 337 (1): 83-91.
- Lewko, B. et al., 2005.** *Characterization of glucose uptake by cultured rat podocytes.* Kidney Blood Press Res, 28 (1): 1-7.
- Li, J. et al., 2005.** *AMP-activated protein kinase activates p38 mitogen-activated protein kinase by increasing recruitment of p38 MAPK to TAB1 in the ischemic heart.* Circ Res, 97 (9): 872-879.
- Li, Y. et al., 2011.** *AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice.* Cell Metab, 13 (4): 376-388.
- Lin, J. et al., 2009.** *Vitamins C and E and beta carotene supplementation and cancer risk: a randomized controlled trial.* J Natl Cancer Inst, 101 (1): 14-23.
- Lin, K. et al., 2001.** *Regulation of the Caenorhabditis elegans longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling.* Nat Genet, 28 (2): 139-145.
- Lin, S. J. et al., 2000.** *Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in Saccharomyces cerevisiae.* Science, 289 (5487): 2126-2128.
- Lin, S. J. et al., 2002.** *Calorie restriction extends Saccharomyces cerevisiae lifespan by increasing respiration.* Nature, 418 (6895): 344-348.
- Link, C. D., 2006.** *C. elegans models of age-associated neurodegenerative diseases: lessons from transgenic worm models of Alzheimer's disease.* Exp Gerontol, 41 (10): 1007-1013.
- Lippman, S. M. et al., 2009.** *Effect of Selenium and Vitamin E on Risk of Prostate Cancer and Other Cancers: The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT).* JAMA, 301 (1): 39-51.
- Liu, F. et al., 2009.** *Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease.* Brain, 132 (Pt 7): 1820-1832.
- Liu, S. et al., 1999.** *Long-term beta-carotene supplementation and risk of type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial.* JAMA, 282 (11): 1073-1075.
- Loh, K. et al., 2009.** *Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity.* Cell Metab, 10 (4): 260-272.
- Lonn, E. et al., 2005.** *Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial.* JAMA, 293 (11): 1338-1347.
- Lopez-Bergami, P., 2011.** *The role of mitogen- and stress-activated protein kinase pathways in melanoma.* Pigment Cell Melanoma Res, 24 (5): 902-921.
- Macleod, A. D., 1998.** *Methylphenidate in terminal depression.* J Pain Symptom Manage, 16 (3): 193-198.

- Mair, W. und A. Dillin, 2008.** *Aging and survival: the genetics of life span extension by dietary restriction.* Annu Rev Biochem, 77 727-754.
- Mair, W. et al., 2005.** *Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in Drosophila.* PLoS Biol, 3 (7): e223.
- Maker, H. S. et al., 1981.** *Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates.* J Neurochem, 36 (2): 589-593.
- Manczak, M. et al., 2004.** *Differential expression of oxidative phosphorylation genes in patients with Alzheimer's disease: implications for early mitochondrial dysfunction and oxidative damage.* Neuromolecular Med, 5 (2): 147-162.
- Marshall, S. et al., 1991.** *Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance.* J Biol Chem, 266 (8): 4706-4712.
- Marshall, S. et al., 2004.** *Dynamic actions of glucose and glucosamine on hexosamine biosynthesis in isolated adipocytes: differential effects on glucosamine 6-phosphate, UDP-N-acetylglucosamine, and ATP levels.* J Biol Chem, 279 (34): 35313-35319.
- Marsin, A. S. et al., 2000.** *Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia.* Curr Biol, 10 (20): 1247-1255.
- Marsin, A. S. et al., 2002.** *The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase.* J Biol Chem, 277 (34): 30778-30783.
- Martins, M. R. et al., 2006.** *Methylphenidate treatment induces oxidative stress in young rat brain.* Brain Res, 1078 (1): 189-197.
- Masoro, E. J., 1998a.** *Hormesis and the antiaging action of dietary restriction.* Exp Gerontol, 33 (1-2): 61-66.
- Masoro, E. J., 1998b.** *Influence of caloric intake on aging and on the response to stressors.* J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 1 (3): 243-257.
- Masoro, E. J., 2005.** *Overview of caloric restriction and ageing.* Mech Ageing Dev, 126 (9): 913-922.
- Masoro, E. J., 2007.** *The role of hormesis in life extension by dietary restriction.* Interdiscip Top Gerontol, 35 1-17.
- McAlindon, T. E. et al., 2000.** *Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis: a systematic quality assessment and meta-analysis.* JAMA, 283 (11): 1469-1475.
- McCay, C. M. et al., 1935.** *The effect of retarded growth upon the length of the life span and upon ultimate body size.* J Nutr, 10 63-79.
- McCubrey, J. A. et al., 2006.** *Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways.* Antioxid Redox Signal, 8 (9-10): 1775-1789.
- McGee, S. L. et al., 2008.** *AMP-activated protein kinase regulates GLUT4 transcription by phosphorylating histone deacetylase 5.* Diabetes, 57 (4): 860-867.

- Medvedev, Z. A., 1990.** *An attempt at a rational classification of theories of ageing.* Biol Rev Camb Philos Soc, 65 (3): 375-398.
- Meguid, M. M. et al., 1995.** *Eating induced rise in LHA-dopamine correlates with meal size in normal and bulbectomized rats.* Brain Res Bull, 36 (5): 487-490.
- Merrill, G. F. et al., 1997.** *AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle.* Am J Physiol, 273 (6 Pt 1): E1107-1112.
- Mihaylova, M. M. et al., 2011.** *Class IIa histone deacetylases are hormone-activated regulators of FOXO and mammalian glucose homeostasis.* Cell, 145 (4): 607-621.
- Milewski, S., 2002.** *Glucosamine-6-phosphate synthase--the multi-facets enzyme.* Biochim Biophys Acta, 1597 (2): 173-192.
- Minokoshi, Y. et al., 2004.** *AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus.* Nature, 428 (6982): 569-574.
- Minor, R. K. et al., 2010.** *Chronic ingestion of 2-deoxy-D-glucose induces cardiac vacuolization and increases mortality in rats.* Toxicol Appl Pharmacol, 243 (3): 332-339.
- Miquel, J. et al., 1980.** *Mitochondrial role in cell aging.* Exp Gerontol, 15 (6): 575-591.
- Monauni, T. et al., 2000.** *Effects of glucosamine infusion on insulin secretion and insulin action in humans.* Diabetes, 49 (6): 926-935.
- Morcos, M. und H. Hutter, 2009.** *The model Caenorhabditis elegans in diabetes mellitus and Alzheimer's disease.* J Alzheimers Dis, 16 (4): 897-908.
- Mukhopadhyay, A. et al., 2006.** *Worming pathways to and from DAF-16/FOXO.* Exp Gerontol, 41 (10): 928-934.
- Murphy, C. T. et al., 2003.** *Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of Caenorhabditis elegans.* Nature, 424 (6946): 277-283.
- Neafsey, P. J., 1990.** *Longevity hormesis. A review.* Mech Ageing Dev, 51 (1): 1-31.
- Nelson, B. A. et al., 2000.** *High glucose and glucosamine induce insulin resistance via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes.* Diabetes, 49 (6): 981-991.
- Nguyen, T. et al., 2003.** *Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 43 233-260.
- Nisoli, E. et al., 2005.** *Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS.* Science, 310 (5746): 314-317.
- Nohl, H. et al., 2003.** *Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artefacts.* Biochem Soc Trans, 31 (Pt 6): 1308-1311.
- Nunomura, A. et al., 2006.** *Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease.* J Neuropathol Exp Neurol, 65 (7): 631-641.
- Oguchi, M. et al., 1977.** *Studies on the metabolism of hexosamine. A kinase activity for D-glucosamine without inhibition by glucose in rat liver and its possible identity with glucokinase.* J Biochem, 82 (2): 559-567.

- Olanow, C. W. et al., 2003.** *Neuroprotection for Parkinson's disease: prospects and promises.* Ann Neurol, 53 Suppl 3 S1-2.
- Olin, J. und P. Masand, 1996.** *Psychostimulants for depression in hospitalized cancer patients.* Psychosomatics, 37 (1): 57-62.
- Oliveira, R. P. et al., 2009.** *Condition-adapted stress and longevity gene regulation by Caenorhabditis elegans SKN-1/Nrf.* Aging Cell, 8 (5): 524-541.
- Omenn, G. S. et al., 1996.** *Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease.* N Engl J Med, 334 (18): 1150-1155.
- Orr, W. C. und R. S. Sohal, 1994.** *Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in Drosophila melanogaster.* Science, 263 (5150): 1128-1130.
- Owusu-Ansah, E. et al., 2008.** *Distinct mitochondrial retrograde signals control the G1-S cell cycle checkpoint.* Nat Genet, 40 (3): 356-361.
- Padala, P. R. et al., 2007.** *Treatment of apathy with methylphenidate.* J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 19 (1): 81-83.
- Panowski, S. H. et al., 2007.** *PHA-4/Foxa mediates diet-restriction-induced longevity of C. elegans.* Nature, 447 (7144): 550-555.
- Park, H. M. et al., 2009.** *Protection against amyloid beta cytotoxicity by sulforaphane: role of the proteasome.* Arch Pharm Res, 32 (1): 109-115.
- Partridge, L. und J. C. Bruning, 2008.** *Forkhead transcription factors and ageing.* Oncogene, 27 (16): 2351-2363.
- Patel, M. und B. J. Day, 1999.** *Metalloporphyrin class of therapeutic catalytic antioxidants.* Trends Pharmacol Sci, 20 (9): 359-364.
- Patti, M. E. et al., 1999.** *Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle.* Diabetes, 48 (8): 1562-1571.
- Pearson, G. et al., 2001.** *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions.* Endocr Rev, 22 (2): 153-183.
- Pehmoller, C. et al., 2009.** *Genetic disruption of AMPK signaling abolishes both contraction- and insulin-stimulated TBC1D1 phosphorylation and 14-3-3 binding in mouse skeletal muscle.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 297 (3): E665-675.
- Perez, V. I. et al., 2009.** *Is the oxidative stress theory of aging dead?* Biochim Biophys Acta, 1790 (10): 1005-1014.
- Petriv, O. I. und R. A. Rachubinski, 2004.** *Lack of peroxisomal catalase causes a progeric phenotype in Caenorhabditis elegans.* J Biol Chem, 279 (19): 19996-20001.
- Pieri, C. et al., 1992.** *Food restriction in female Wistar rats: V. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in the liver.* Arch Gerontol Geriatr, 14 (1): 93-99.
- Piper, M. D. und A. Bartke, 2008.** *Diet and aging.* Cell Metab, 8 (2): 99-104.

- Piper, P. W. et al., 2006.** *Preadaptation to efficient respiratory maintenance is essential both for maximal longevity and the retention of replicative potential in chronologically ageing yeast.* Mech Ageing Dev, 127 (9): 733-740.
- Piperno, M. et al., 2000.** *Glucosamine sulfate modulates dysregulated activities of human osteoarthritic chondrocytes in vitro.* Osteoarthritis Cartilage, 8 (3): 207-212.
- Pocobelli, G. et al., 2010.** *Total mortality risk in relation to use of less-common dietary supplements.* Am J Clin Nutr, 91 (6): 1791-1800.
- Pollak, L. et al., 2007.** *Low dose methylphenidate improves freezing in advanced Parkinson's disease during off-state.* J Neural Transm Suppl, (72): 145-148.
- Poulin, G. et al., 2004.** *Genome-wide RNAi screens in Caenorhabditis elegans: impact on cancer research.* Oncogene, 23 (51): 8340-8345.
- Powers, R. W., 3rd et al., 2006.** *Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling.* Genes Dev, 20 (2): 174-184.
- Powers, S. K. und M. J. Jackson, 2008.** *Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production.* Physiol Rev, 88 (4): 1243-1276.
- Przedborski, S. et al., 1993.** *Chronic levodopa administration alters cerebral mitochondrial respiratory chain activity.* Ann Neurol, 34 (5): 715-723.
- Rahman, S. et al., 2006.** *Methylphenidate ('Ritalin') can ameliorate abnormal risk-taking behavior in the frontal variant of frontotemporal dementia.* Neuropsychopharmacology, 31 (3): 651-658.
- Raizen, D. M. et al., 1995.** *Interacting genes required for pharyngeal excitation by motor neuron MC in Caenorhabditis elegans.* Genetics, 141 (4): 1365-1382.
- Rao, G. et al., 1990.** *Effect of dietary restriction on the age-dependent changes in the expression of antioxidant enzymes in rat liver.* J Nutr, 120 (6): 602-609.
- Rappley, M. D., 2005.** *Clinical practice. Attention deficit-hyperactivity disorder.* N Engl J Med, 352 (2): 165-173.
- Rattan, S. I. und D. Demirovic, 2010.** *Hormesis as a Mechanism for the Anti-Aging Effects of Calorie Restriction.* Calorie Restriction, Aging and Longevity, Number of 233-245,
- Rautalahti, M. T. et al., 1999.** *The effects of supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene on the incidence and mortality of carcinoma of the pancreas in a randomized, controlled trial.* Cancer, 86 (1): 37-42.
- Rea, S. und T. E. Johnson, 2003.** *A metabolic model for life span determination in Caenorhabditis elegans.* Dev Cell, 5 (2): 197-203.
- Rhee, S. G. et al., 2003.** *Cellular regulation by hydrogen peroxide.* J Am Soc Nephrol, 14 (8 Suppl 3): S211-215.
- Riccioni, G. et al., 2007.** *The role of the antioxidant vitamin supplementation in the prevention of cardiovascular diseases.* Expert Opin Investig Drugs, 16 (1): 25-32.
- Riddle, D. L. et al., 1997.** *Introduction to C. elegans.* C. elegans II, Number of Cold Spring Harbor (NY).

- Ristow, M. und S. Schmeisser, 2011.** *Extending life span by increasing oxidative stress.* Free Radic Biol Med, 51 (2): 327-336.
- Ristow, M. et al., 2009.** *Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans.* Proc Nat Acad Sci, 106 (21): 8665-8670.
- Robinson, K. A. et al., 1993.** *Pre-exposure to glucosamine induces insulin resistance of glucose transport and glycogen synthesis in isolated rat skeletal muscles. Study of mechanisms in muscle and in rat-1 fibroblasts overexpressing the human insulin receptor.* Diabetes, 42 (9): 1333-1346.
- Rogacka, D. et al., 2010.** *Expression of GFAT1 and OGT in podocytes: transport of glucosamine and the implications for glucose uptake into these cells.* J Cell Physiol, 225 (2): 577-584.
- Rogina, B. und S. L. Helfand, 2004.** *Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction.* Proc Natl Acad Sci U S A, 101 (45): 15998-16003.
- Rosa Neto, P. et al., 2002.** *Methylphenidate-evoked potentiation of extracellular dopamine in the brain of adolescents with premature birth: correlation with attentional deficit.* Ann N Y Acad Sci, 965 434-439.
- Rovelet-Lecrux, A. et al., 2006.** *APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy.* Nat Genet, 38 (1): 24-26.
- Sacco, M. et al., 2003.** *Primary prevention of cardiovascular events with low-dose aspirin and vitamin E in type 2 diabetic patients: results of the Primary Prevention Project (PPP) trial.* Diabetes Care, 26 (12): 3264-3272.
- Sawin, E. R. et al., 2000.** *C. elegans locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway.* Neuron, 26 (3): 619-631.
- Schafer, W. R. und C. J. Kenyon, 1995.** *A calcium-channel homologue required for adaptation to dopamine and serotonin in Caenorhabditis elegans.* Nature, 375 (6526): 73-78.
- Schreiber, H. L. et al., 1976.** *The role of locomotion in conditioning methylphenidate-induced locomotor activity.* Pharmacol Biochem Behav, 4 (4): 393-395.
- Schreiber, M. A. und S. L. McIntire, 2011.** *A Caenorhabditis elegans p38 MAP kinase pathway mutant protects from dopamine, methamphetamine, and MDMA toxicity.* Neurosci Lett, 498 (1): 99-103.
- Schulz, T. J. et al., 2007.** *Glucose restriction extends Caenorhabditis elegans life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress.* Cell Metab, 6 (4): 280-293.
- Semsei, I. et al., 1989.** *Changes in the expression of superoxide dismutase and catalase as a function of age and dietary restriction.* Biochem Biophys Res Commun, 164 (2): 620-625.
- Sesso, H. D. et al., 2008.** *Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial.* JAMA, 300 (18): 2123-2133.
- Sharma, P. K. et al., 2011.** *Mitochondria-mediated hormetic response in life span extension of calorie-restricted Saccharomyces cerevisiae.* Age (Dordr), 33 (2): 143-154.
- Sherer, T. B. et al., 2003.** *Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease.* J Neurosci, 23 (34): 10756-10764.

- Shikhman, A. R. et al., 2009.** *Differential metabolic effects of glucosamine and N-acetylglucosamine in human articular chondrocytes.* Osteoarthritis Cartilage, 17 (8): 1022-1028.
- Silverman, J. L., 1963.** *Glucosamine Inhibition of (I-14c)Glucose Oxidation as Measured by Rat Adipose Tissue in Vitro.* Biochim Biophys Acta, 78 94-100.
- Simon, R. R. et al., 2011.** *A comprehensive review of oral glucosamine use and effects on glucose metabolism in normal and diabetic individuals.* Diabetes Metab Res Rev, 27 (1): 14-27.
- Skorupa, D. A. et al., 2008.** *Dietary composition specifies consumption, obesity, and lifespan in Drosophila melanogaster.* Aging Cell, 7 (4): 478-490.
- Sohal, R. S., 2002.** *Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process.* Free Radic Biol Med, 33 (1): 37-44.
- Sohal, R. S. et al., 1993.** *Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies.* Proc Natl Acad Sci U S A, 90 (15): 7255-7259.
- Sohal, R. S. et al., 1990.** *Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species.* Mech Ageing Dev, 53 (3): 217-227.
- Song, Y. et al., 2009.** *Effects of vitamins C and E and beta-carotene on the risk of type 2 diabetes in women at high risk of cardiovascular disease: a randomized controlled trial.* Am J Clin Nutr, 90 (2): 429-437.
- Southam, C. M., 1943.** *Effects of Extract of Western Red-cedar Heartwood on Certain Wood-decaying Fungi in Culture.*
- Sreekumar, R. et al., 2002.** *Effects of caloric restriction on mitochondrial function and gene transcripts in rat muscle.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 283 (1): E38-43.
- Srere, P. A. et al., 1963.** *Citrate Condensing Enzyme of Pigeon Breast Muscle and Moth Flight Muscle.* Acta Chemica Scandinavica, 17 129-&.
- Stadtman, E. R., 1992.** *Protein oxidation and aging.* Science, 257 (5074): 1220-1224.
- Steinkraus, K. A. et al., 2008.** *Dietary restriction suppresses proteotoxicity and enhances longevity by an hsf-1-dependent mechanism in Caenorhabditis elegans.* Aging Cell, 7 (3): 394-404.
- Stenesen, D. et al., 2013.** *Adenosine nucleotide biosynthesis and AMPK regulate adult life span and mediate the longevity benefit of caloric restriction in flies.* Cell Metab, 17 (1): 101-112.
- Stiernagle, T., 2006.** *Maintenance of C. elegans.* WormBook, 1-11.
- Sulston, J. et al., 1975.** *Dopaminergic neurons in the nematode Caenorhabditis elegans.* J Comp Neurol, 163 (2): 215-226.
- Sumitani, M. et al., 2011.** *Biochemical properties of Caenorhabditis elegans HMG-5, a regulator of mitochondrial DNA.* J Biochem, 149 (5): 581-589.
- Suo, S. et al., 2002.** *Identification of a dopamine receptor from Caenorhabditis elegans.* Neurosci Lett, 319 (1): 13-16.
- Suo, S. et al., 2003.** *Cloning and characterization of a Caenorhabditis elegans D2-like dopamine receptor.* J Neurochem, 86 (4): 869-878.

- Suzuki, N. et al., 1994.** *An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants.* Science, 264 (5163): 1336-1340.
- Swierczek, N. A. et al., 2011.** *High-throughput behavioral analysis in C. elegans.* Nat Methods, 8 (7): 592-598.
- Szewczyk, N. J. et al., 2006.** *Delayed development and lifespan extension as features of metabolic lifestyle alteration in C. elegans under dietary restriction.* J Exp Biol, 209 (Pt 20): 4129-4139.
- Tapia, P. C., 2006.** *Sublethal mitochondrial stress with an attendant stoichiometric augmentation of reactive oxygen species may precipitate many of the beneficial alterations in cellular physiology produced by caloric restriction, intermittent fasting, exercise and dietary phytonutrients: "Mitohormesis" for health and vitality.* Med Hypotheses, 66 (4): 832-843.
- Tatar, M. et al., 2003.** *The endocrine regulation of aging by insulin-like signals.* Science, 299 (5611): 1346-1351.
- Taub, J. et al., 1999.** *A cytosolic catalase is needed to extend adult lifespan in C. elegans daf-C and clk-1 mutants.* Nature, 399 (6732): 162-166.
- Teixeira, A. L., Jr. und P. Caramelli, 2006.** *[Apathy in Alzheimer's disease].* Rev Bras Psiquiatr, 28 (3): 238-241.
- Tesoriere, G. et al., 1975.** *Inhibitory effect of D-glucosamine on glycolysis in bovine retina.* Biochim Biophys Acta, 385 (1): 58-67.
- Testa, C. M. et al., 2005.** *Rotenone induces oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra cultures.* Brain Res Mol Brain Res, 134 (1): 109-118.
- Tiku, M. L. et al., 2007.** *Glucosamine prevents in vitro collagen degradation in chondrocytes by inhibiting advanced lipoxidation reactions and protein oxidation.* Arthritis Res Ther, 9 (4): R76.
- Tissenbaum, H. A. und L. Guarente, 2001.** *Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in Caenorhabditis elegans.* Nature, 410 (6825): 227-230.
- Tong, Y. und G. Pelletier, 1992.** *Role of dopamine in the regulation of proopiomelanocortin (POMC) mRNA levels in the arcuate nucleus and pituitary gland of the female rat as studied by in situ hybridization.* Brain Res Mol Brain Res, 15 (1-2): 27-32.
- Trinh, K. et al., 2008.** *Induction of the phase II detoxification pathway suppresses neuron loss in Drosophila models of Parkinson's disease.* J Neurosci, 28 (2): 465-472.
- Troemel, E. R. et al., 2006.** *p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in C. elegans.* PLoS Genet, 2 (11): e183.
- Tsuchiya, M. et al., 2006.** *Sirtuin-independent effects of nicotinamide on lifespan extension from calorie restriction in yeast.* Aging Cell, 5 (6): 505-514.
- Tullet, J. M. et al., 2008.** *Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in C. elegans.* Cell, 132 (6): 1025-1038.
- Turrens, J. F., 1997.** *Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain.* Biosci Rep, 17 (1): 3-8.
- Uldry, M. et al., 2002.** *GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter.* FEBS Lett, 524 (1-3): 199-203.

- van Heemst, D. et al., 2005.** *Reduced insulin/IGF-1 signalling and human longevity.* Aging Cell, 4 (2): 79-85.
- Van Raamsdonk, J. M. und S. Hekimi, 2012.** *Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan.* Proc Natl Acad Sci U S A, 109 (15): 5785-5790.
- Van Schaftigen, E., 1995.** *Glucosamine-sensitive and -insensitive deamination of [2-3H]glucose in isolated rat hepatocytes: a study of the contributions of glucokinase and glucose-6-phosphatase.* Biochem J, 308 (Pt 1) 23-29.
- Vandercammen, A. und E. Van Schaftigen, 1991.** *Competitive inhibition of liver glucokinase by its regulatory protein.* Eur J Biochem, 200 (2): 545-551.
- Vanfleteren, J. R. und B. P. Braeckman, 1999.** *Mechanisms of life span determination in Caenorhabditis elegans.* Neurobiol Aging, 20 (5): 487-502.
- Vargas, M. R. et al., 2008.** *Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis.* J Neurosci, 28 (50): 13574-13581.
- Veal, E. A. et al., 2007.** *Hydrogen peroxide sensing and signaling.* Mol Cell, 26 (1): 1-14.
- Vellai, T. et al., 2003.** *Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in C. elegans.* Nature, 426 (6967): 620.
- Venugopal, R. und A. K. Jaiswal, 1996.** *Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene.* Proc Natl Acad Sci U S A, 93 (25): 14960-14965.
- Vina, J. et al., 1992.** *Effect of aging on glutathione metabolism. Protection by antioxidants.* EXS, 62 136-144.
- Virkamaki, A. und H. Yki-Jarvinen, 1999.** *Allosteric regulation of glycogen synthase and hexokinase by glucosamine-6-phosphate during glucosamine-induced insulin resistance in skeletal muscle and heart.* Diabetes, 48 (5): 1101-1107.
- Virtamo, J. et al., 2000.** *Effects of supplemental alpha-tocopherol and beta-carotene on urinary tract cancer: incidence and mortality in a controlled trial (Finland).* Cancer Causes Control, 11 (10): 933-939.
- Vivekananthan, D. P. et al., 2003.** *Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials.* Lancet, 361 (9374): 2017-2023.
- Volkow, N. D. et al., 2001.** *Therapeutic doses of oral methylphenidate significantly increase extracellular dopamine in the human brain.* J Neurosci, 21 (2): RC121.
- Volkow, N. D. et al., 1999.** *Methylphenidate and cocaine have a similar in vivo potency to block dopamine transporters in the human brain.* Life Sci, 65 (1): PL7-12.
- Volkow, N. D. et al., 1998.** *Dopamine transporter occupancies in the human brain induced by therapeutic doses of oral methylphenidate.* Am J Psychiatry, 155 (10): 1325-1331.
- Volkow, N. D. et al., 2007.** *Depressed dopamine activity in caudate and preliminary evidence of limbic involvement in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder.* Arch Gen Psychiatry, 64 (8): 932-940.

- Volz, T. J., 2008.** *Neuropharmacological mechanisms underlying the neuroprotective effects of methylphenidate.* Curr Neuropharmacol, 6 (4): 379-385.
- Vrillas-Mortimer, A. et al., 2011.** *A muscle-specific p38 MAPK/Mef2/MnSOD pathway regulates stress, motor function, and life span in Drosophila.* Dev Cell, 21 (4): 783-795.
- Walker, Q. D. et al., 2010.** *Dopamine uptake inhibitors but not dopamine releasers induce greater increases in motor behavior and extracellular dopamine in adolescent rats than in adult male rats.* J Pharmacol Exp Ther, 335 (1): 124-132.
- Wang, G. J. et al., 2002.** *The role of dopamine in motivation for food in humans: implications for obesity.* Expert Opin Ther Targets, 6 (5): 601-609.
- Wang, Y. und H. A. Tissenbaum, 2006.** *Overlapping and distinct functions for a Caenorhabditis elegans SIR2 and DAF-16/FOXO.* Mech Ageing Dev, 127 (1): 48-56.
- Ward, N. C. et al., 2007.** *The effect of vitamin E on blood pressure in individuals with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.* J Hypertens, 25 (1): 227-234.
- Weindruch, R., 2006.** *Will dietary restriction work in primates?* Biogerontology, 7 (3): 169-171.
- Weinshenker, D. et al., 1995.** *Genetic and pharmacological analysis of neurotransmitters controlling egg laying in C. elegans.* J Neurosci, 15 (10): 6975-6985.
- White, J. C. et al., 1992.** *Methylphenidate as a treatment for depression in acquired immunodeficiency syndrome: an n-of-1 trial.* J Clin Psychiatry, 53 (5): 153-156.
- Wilens, T. E., 2008.** *Effects of methylphenidate on the catecholaminergic system in attention-deficit/hyperactivity disorder.* J Clin Psychopharmacol, 28 (3 Suppl 2): S46-53.
- Wilquet, V. und B. De Strooper, 2004.** *Amyloid-beta precursor protein processing in neurodegeneration.* Curr Opin Neurobiol, 14 (5): 582-588.
- Wolosker, H. et al., 1998.** *Molecularly cloned mammalian glucosamine-6-phosphate deaminase localizes to transporting epithelium and lacks oscillin activity.* FASEB J, 12 (1): 91-99.
- Wood, J. G. et al., 2004.** *Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans.* Nature, 430 (7000): 686-689.
- Wooters, T. E. et al., 2011.** *Effect of environmental enrichment on methylphenidate-induced locomotion and dopamine transporter dynamics.* Behav Brain Res, 219 (1): 98-107.
- Wruck, C. J. et al., 2008.** *Kavalactones protect neural cells against amyloid beta peptide-induced neurotoxicity via extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent nuclear factor erythroid 2-related factor 2 activation.* Mol Pharmacol, 73 (6): 1785-1795.
- Wu, G. et al., 2001.** *Presence of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase for glucosamine-6-phosphate synthesis in endothelial cells: effects of hyperglycaemia and glutamine.* Diabetologia, 44 (2): 196-202.
- Xia, E. et al., 1995.** *Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male Fischer 344 rats are altered by food restriction.* J Nutr, 125 (2): 195-201.
- Xu, Z. et al., 2005.** *Liver-specific inactivation of the Nrf1 gene in adult mouse leads to nonalcoholic steatohepatitis and hepatic neoplasia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 102 (11): 4120-4125.

- Yan, Y. et al., 2007.** *The antioxidative and immunostimulating properties of D-glucosamine.* Int Immunopharmacol, 7 (1): 29-35.
- Yang, N.-C. et al., 2002.** *A Convenient One-Step Extraction of Cellular ATP Using Boiling Water for the Luciferin–Luciferase Assay of ATP.* Analytical Biochemistry, 306 (2): 323-327.
- Yang, W. und S. Hekimi, 2010.** *Two modes of mitochondrial dysfunction lead independently to lifespan extension in Caenorhabditis elegans.* Aging Cell, 9 (3): 433-447.
- Yang, Z. J. et al., 1996.** *Eating-related increase of dopamine concentration in the LHA with oronasal stimulation.* Am J Physiol, 270 (2 Pt 2): R315-318.
- Yano, M. und H. Steiner, 2007.** *Methylphenidate and cocaine: the same effects on gene regulation?* Trends Pharmacol Sci, 28 (11): 588-596.
- Yashin, A. I. et al., 2001.** *Ageing and survival after different doses of heat shock: the results of analysis of data from stress experiments with the nematode worm Caenorhabditis elegans.* Mech Ageing Dev, 122 (13): 1477-1495.
- Youngman, L. D. et al., 1992.** *Protein oxidation associated with aging is reduced by dietary restriction of protein or calories.* Proc Natl Acad Sci U S A, 89 (19): 9112-9116.
- Yu, B. P. und H. Y. Chung, 2001.** *Stress resistance by caloric restriction for longevity.* Ann N Y Acad Sci, 928 39-47.
- Zarse, K. et al., 2012.** *Impaired Insulin/IGF1 Signaling Extends Life Span by Promoting Mitochondrial L-Proline Catabolism to Induce a Transient ROS Signal.* Cell Metabolism, 15 (4): 451-465.
- Zhou, G. et al., 2001.** *Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action.* J Clin Invest, 108 (8): 1167-1174.
- Zong, H. et al., 2002.** *AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 99 (25): 15983-15987.
- Zuin, A. et al., 2010.** *Lifespan extension by calorie restriction relies on the Sty1 MAP kinase stress pathway.* EMBO J, 29 (5): 981-991.
- Zureik, M. et al., 2004.** *Effects of long-term daily low-dose supplementation with antioxidant vitamins and minerals on structure and function of large arteries.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 24 (8): 1485-1491.

Anhang

Tabelle 6: Chemikalien und Reagenzien

Beschreibung	Hersteller
Acetyl-CoA	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Acrylamid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ampliflu™ Red	Sigma (Steinheim, Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
6-Amino-hexansäure	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Agar Agar	SERVA high-strength (Heidelberg, Deutschland)
Agarose	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Ammoniumacetat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Ampicillin Natriumsalz	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumpersulfat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Bicin	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
BCA-Reagenz, Bicinchoninsäure (<i>bicinchoninic acid</i> ; BCA)	Thermo Scientific (Deutschland)
Bromphenolblau	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Calciumchlorid	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Catalase Assay Kit	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
CellTiter-Glo®	Promega (Mannheim, Deutschland)
Cholesterol	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche (Deutschland)
Cytochalasin B	Sigma (Steinheim, Deutschland)
2-Deoxy-Glucose, D[U-14C]	PerkinElmer (Boston, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Di-Natriumhydrogenphosphat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
DTNB	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
DTPA	Sigma (Steinheim, Deutschland)
EDTA	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol (vergällt)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Formaldehyd	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	Thermo Scientific (Deutschland)
Glucosaminhydrochlorid	Fluka (Buchs, Schweiz)
Glucose	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Glucose, D [U-14C]	PerkinElmer (Boston, USA)
Glycerol	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Glycin	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
HRP, <i>horse radish peroxidase</i>	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Hypoxanthin	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumhydroxid	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumperiodat	Fluka (Buchs, Schweiz)
Kaliumphosphat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
LB Agar Gibco	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Loading Dye 6x (RNA)	Thermo Scientific (Deutschland)
Magnesiumsulfat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
MitoTracker® Red CM-H2XRos	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
MOPS	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumacetat-Trihydrat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
N-Acetyl-L-Cystein	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Natriumchlorid	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumfluorid	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Natriumhypochlorid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumhydroxid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumorthovanadat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Nystatin-Dihydrat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Oxalacetat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Paraquat (Methyl Viologen Hydrate)	Thermo Scientific (Deutschland)
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific (Deutschland)
Peptone from casein, pancreatic digest	Fluka (Buchs, Schweiz)

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Ponceau	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Polybead® Microspheres 0,1 µm	Polysciences, Inc.(Warrington, PA)
Proteinase K	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Proteinassay Farbstoffkonzentrat	BioRad Laboratories (Hercules, Kalifornien)
Purpald	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Salzsäure	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ritalin (Methylphenidathydrochlorid)	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Rotenon	Sigma (Steinheim, Deutschland)
SDS	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Streptomycinsulfat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Superoxiddismutase (SOD), bovine / Kit	Sigma (Steinheim, Deutschland)
SYBR Green	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
TEMED	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Tetramisol Hydrochlorid	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Trichloressigsäure	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
TG Triglyceride GPO-PAP; 12016648	Roche (Deutschland)
Tris	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Tris-Base	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Tris-HCl	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Triton X-100	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Trizol	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Trypton	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Tween20	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Wasserstoffperoxid	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
WST-1	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Xanthin-Oxidase	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Yeast Extract	Fluka (Buchs, Schweiz)

Tabelle 7: Laborgeräte und Arbeitsmittel

Beschreibung	Hersteller
Accujet pro	Brand GmbH & Co KG (Schwertheim, Deutschland)
Analysen-/ Präzisionswaage XT 120 A	Precisa (Dietikon, Schweiz)
Autoklav Systec V65	Systec (Wettenberg, Deutschland)
Bechergläser	Duran Group (Mainz; Deutschland)
Brutschrank	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Brutschrank	Heraeus Haake B6 Kendro (Langenselbold, Deutschland)
Brutschrank TS 606/2-i	WTW (Weilheim, Deutschland)
Combitips plus, 5 ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Einkanalpipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Falcons (50 ml, 15 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Fluorimeter LF402 ProLine	IOM, Berlin, Germany
FLUOstar OPTIMA	BMG Labtech (Offenburg, Deutschland)
Gelständer Bio Rad	(Hercules, Kalifornien)
Halbmikro Einwegküvetten	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Küvetten, 1,5 ml	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Laborflaschen	Duran Group (Mainz; Deutschland)
Löffelspatel; Pulverspatel	VWR (Darmstadt; Deutschland)
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland)
Mikroplatte, 96-Well, weiß, nicht transparenter Boden	greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
Mikroplatte, 96-Well, schwarz, nicht transparenter Boden	greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
Mikrotestplatten, 96-Well, transparent	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Metallblockthermostat	VLM (Leopoldshöhe, Deutschland)
Mikrofilter Filtropur BT 50 500 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Mikroskop Axiovert 100 SMZ-140 Series	Carl Zeiss (Deutschland) Motic (China)
Mikroskopkamera ProgRes® CT1	JenOptik (Jena, Deutschland)

Mikrotiter Plattenleser	Novostar BMG Labtech GmbH (Offenburg, Deutschland)
Multipipette plus	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Mikroliterpipetten, verschiedene	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
NanoDrop 2000	Thermo Scientific (Deutschland)
Oxygraph Sauerstoffelektrode (Clark-Typ)	Hansatech (Pentney, Großbritannien)
Parafilm®	Pechney Plastic Packing (Chicago, USA)
Pasteurpipetten, Standard	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Petrischalen steril 55 mm	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Petrischalen steril 90 mm	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
pH Meter 766	Knick (Berlin, Deutschland)
Plattenschüttler TitroMax 1000	Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland)
Reagiergefäße (1,5 ml, 2 ml, 0,65 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Rotilab-Mikrotest-Platten (unsteril)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Rotilab-Spritzenfilter steril, PVDF 0,22 µm	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Schüttelinkubator 3032	GFL (Großburgwedel, Deutschland)
Schüttelkolben	Duran Group (Mainz, Deutschland)
Schüttler Vortex Genie 2 G-560E	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Schwingmühle MM 400	Retsch (Haan, Deutschland)
Serologische Pipetten	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Spectralphotometer DU 640	Beckman Instruments (Fullerton, CA, USA)
Stereomikroskop SMZ-140	Motic (Wetzlar, Deutschland)
Sterilbänke Hera Safe KS 15 Gelaire	Heraeus (München, Deutschland) Flow Laboratories (Meckenheim, Dtl.)
Stoppuhr	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Thermomixer	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Titramax 1000	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Trans-blot SD	Bio Rad (Hercules, California)
Travelmate 6293	Acer (New Taipei City, Taiwan)
Reagensröhren	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Rotilab-Spritzenfilter, steril	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Ultraschallhomogenisator	Labsonic M Braun Biotech (Melsungen, Deutschland)
Vakuumfiltrationsgerät	Schleicher & Schnell Whatman GmbH (Dassel, Deutschland)
Vinothek WT 4176	Grand Cru Liebherr (Ochsenhausen, Deutschland)
Wassieranlage: Milli-Q Synthesis A10	Millipore (Billerica, USA)
Wasserbad	Haake C10-W26 Thermo Electron Corporation (Waltham, USA)
Wipptisch	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Tabelle 8: Statistische Analysen der Lebenskurven unter GlcN-Behandlung.

Stamm, Substanz, Lsgm.	Max. Lebenserwartung ¹ [d] [± SEM]	Mittl. Lebenserwartung [d] [± SEM]	P-Wert (vs. Kontrolle, siehe Fußnote)	Anzahl der Experimente [n]	Anzahl der Nematoden [n]
N2 H ₂ O	23,00 ± 1,0	21,04 ± 0,2		15	1835
N2 GlcN / H ₂ O	24,25 ± 1,3	22,25 ± 0,2	< 0,0001 ^a	15	1830
N2 H ₂ O	25,00 ± 0,0	21,71 ± 0,3		3	420
N2 10 µM GlcN / H ₂ O	25,00 ± 0,0	22,20 ± 0,3	< 0,01 ^a	3	428
N2 100 µM GlcN / H ₂ O	27,00 ± 0,0	23,44 ± 0,3	< 0,0001 ^a	3	399
N2 1000 µM GlcN / H ₂ O	26,33 ± 1,2	23,33 ± 0,3	< 0,0001 ^a	3	442
<i>aak-2</i> (ok524) H ₂ O	19,67 ± 1,2	17,63 ± 0,3		3	397
<i>aak-2</i> (ok524) GlcN / H ₂ O	19,67 ± 1,2	17,60 ± 0,3	n.s. ^b	3	397
<i>sir2.1</i> (ok434) H ₂ O	22,67 ± 0,6	19,50 ± 0,4		3	294
<i>sir2.1</i> (ok434) GlcN / H ₂ O	23,00 ± 0,0	20,14 ± 0,4	< 0,05 ^c	3	315
N2 H ₂ O	24,67 ± 1,2	21,39 ± 0,4		3	370
N2 GlcN / H ₂ O	26,00 ± 0,0	22,75 ± 0,4	< 0,0001 ^a	3	338
N2 NAC / H ₂ O	24,67 ± 1,2	21,82 ± 0,4	n.s. ^a	3	372
N2 GlcN / H ₂ O / NAC / H ₂ O	24,67 ± 1,2	21,55 ± 0,4	n.s. ^a	3	346
N2 H ₂ O	23,67 ± 1,2	21,06 ± 0,4		3	348
N2 GlcN / H ₂ O	25,00 ± 0,0	22,53 ± 0,4	< 0,0001 ^a	3	305
N2 BHA / DMSO	23,00 ± 0,0	20,96 ± 0,4	n.s. ^a	3	320
N2 GlcN / H ₂ O / BHA / DMSO	23,00 ± 0,0	20,67 ± 0,4	n.s. ^a	3	325
<i>pmk-1</i> (km25) H ₂ O	24,00 ± 0,0	20,46 ± 0,3		6	456
<i>pmk-1</i> (km25) GlcN / H ₂ O	24,00 ± 0,0	20,76 ± 0,3	n.s. ^d	6	388

Tabelle 8 (weiterführend): Statistische Analysen der Lebenskurven unter GlcN-Behandlung.

Stamm, Substanz, Lsgm.	Max. Lebenserwartung ¹ [d] [± SEM]	Mittl. Lebenserwartung [d] [± SEM]	P-Wert (vs. Kontrolle, siehe Fußnote)	Anzahl der Experimente [n]	Anzahl der Nematoden [n]
<i>daf-16</i> (mu86) H ₂ O	21,00 ± 0,0	18,27 ± 0,3		3	443
<i>daf-16</i> (mu86) GlcN / H ₂ O	21,00 ± 0,0	19,01 ± 0,3	< 0,05 ^e	3	431
<i>skn-1</i> (zu135) H ₂ O	19,67 ± 1,2	17,34 ± 0,5		3	200
<i>skn-1</i> (zu135) GlcN / H ₂ O	19,00 ± 0,0	16,64 ± 0,5	n.s. ^f	3	190

¹ 75% Quantil

GlcN: 100 µM (wenn nicht anders vermerkt); NAC: 1 mM; BHA: 10 µM

Kontrollen: ^a N₂ H₂O; ^b *aak-2* (ok524) H₂O; ^c *sir2.1* (ok524) H₂O; ^d *pmk-1* (km25) H₂O; ^e *daf-16* (mu86) H₂O; ^f *skn-1*(zu135) H₂O

Tabelle 9: Statistische Analysen der Lebenskurven unter Ritalin-Behandlung.

Stamm, Substanz, Lsgm.	Max. Lebenserwartung ¹ [d] [± SEM]	Mittl. Lebenserwartung [d] [± SEM]	P-Wert (vs. Kontrolle, siehe Fußnote)	Anzahl der Experimente [n]	Anzahl der Nematoden [n]
N2 H ₂ O	23,00 ± 0,0	21,12 ± 0,2		6	638
N2 Ritalin / H ₂ O	24,50 ± 2,1	22,05 ± 0,2	< 0,0001 ^a	6	639
<i>aak-2</i> (ok524) H ₂ O	21,33 ± 1,2	18,59 ± 0,3		3	425
<i>aak-2</i> (ok524) Ritalin / H ₂ O	20,67 ± 1,2	18,19 ± 0,3	n.s. ^b	3	381
N2 H ₂ O	18,00 ± 0,0	21,47 ± 0,4		3	306
N2 Ritalin / H ₂ O	20,00 ± 1,7	22,78 ± 0,4	< 0,0001 ^a	3	289
N2 NAC / H ₂ O	25,00 ± 1,7	20,44 ± 0,4	n.s. ^a	3	306
N2 Ritalin / H ₂ O / NAC / H ₂ O	23,33 ± 2,5	20,32 ± 0,4	n.s. ^a	3	298
<i>pmk-1</i> (km25) H ₂ O	24,67 ± 1,2	21,63 ± 0,8		3	88
<i>pmk-1</i> (km25) Ritalin / H ₂ O	24,00 ± 0,0	20,90 ± 0,7	n.s. ^c	3	123
<i>daf-16</i> (mu86) H ₂ O	23,00 ± 0,0	20,11 ± 0,3		3	99
<i>daf-16</i> (mu86) Ritalin / H ₂ O	22,33 ± 1,2	19,86 ± 0,4	n.s. ^d	3	117
<i>skn-1</i> (zu135) H ₂ O	20,33 ± 1,4	17,82 ± 0,4		3	240
<i>skn-1</i> (zu135) Ritalin / H ₂ O	19,00 ± 0,0	17,51 ± 0,4	n.s. ^e	3	240
<i>skn-1</i> (zu67) H ₂ O	19,00 ± 0,0	16,74 ± 0,5		3	140
<i>skn-1</i> (zu67) Ritalin / H ₂ O	19,67 ± 1,2	17,79 ± 0,4	< 0,01 ^f	3	194
<i>cat-2</i> (e1112) H ₂ O	22,00 ± 1,7	20,04 ± 0,4		3	320
<i>cat-2</i> (e1112) Ritalin / H ₂ O	22,00 ± 1,7	19,59 ± 0,3	n.s. ^g	3	320

Tabelle 9 (weiterführend): Statistische Analysen der Lebenskurven unter Ritalin-Behandlung.

Stamm, Substanz, Lsgm.	Max. Lebenserwartung ¹ [d] [± SEM]	Mittl. Lebenserwartung [d] [± SEM]	P-Wert (vs. Kontrolle, siehe Fußnote)	Anzahl der Experimente [n]	Anzahl der Nematoden [n]
<i>dat-1</i> (ok157) H ₂ O	23,00 ± 0,0	20,17 ± 0,4		3	306
<i>dat-1</i> (ok157) Ritalin / H ₂ O	23,00 ± 0,0	20,57 ± 0,3	n.s. ^h	3	432
LX734 (<i>dop-1</i> , <i>dop-2</i> , <i>dop-3</i>) H ₂ O	23,33 ± 0,6	21,02 ± 0,3		3	330
LX734 (<i>dop-1</i> , <i>dop-2</i> , <i>dop-3</i>) / Ritalin	22,33 ± 0,6	20,53 ± 0,3	n.s. ⁱ	3	312
² <i>ky/s128</i> (n765)	26,00 ± 0,0	22,70 ± 0,8		3	60
² <i>ky/s128</i> (n765) Ritalin / H ₂ O	26,00 ± 0,0	22,57 ± 0,8	n.s. ^j	3	64
³ <i>ky/s128</i> (n765) H ₂ O	25,00 ± 0,0	22,07 ± 0,5		3	103
³ <i>ky/s128</i> (n765) Ritalin / H ₂ O	26,00 ± 0,0	23,59 ± 0,5	< 0,001 ^k	3	102
N2 H ₂ O	23,00 ± 1,7	21,04 ± 0,4		3	296
N2 Dopamin / H ₂ O	24,00 ± 1,7	22,12 ± 0,4	< 0,001 ^a	3	315
N2 Dopamin + Ritalin / H ₂ O	25,33 ± 0,6	22,68 ± 0,4	< 0,0001 ^a	3	301

¹ 75% Quantil; ² mit ASI Ablation; ³ ohne ASI Ablation

Ritalin: 5 µM; NAC: 1 mM; BHA: 10 µM

Kontrollen: ^a N2 H₂O; ^b *aak-2* (ok524) H₂O; ^c *pmk-1* (km25) H₂O; ^d *daf-16* (mu86) H₂O; ^e *skn-1*(zu135) H₂O; ^f *skn-1*(zu67) H₂O; ^g *cat-2*(e1112) H₂O;
^h *dat-1* (ok157) H₂O; ⁱ LX734 H₂O; ^j *ky/s128* (n765) H₂O (ASI Ablation); ^k *ky/s128* (n765) H₂O (ohne ASI Ablation)

Manuskripte und Wissenschaftliche Vorträge

- Manuskript zur Einreichung in „Cell“:

“D-Glucosamine Supplementation Promotes Mitochondrial Biogenesis to Extend Lifespan of Nematodes and Aging Mice”

Josephine Priebs^{1,*}, Sandra Weimer^{2,3*}, Doreen Kuhlow^{1,3*}, Marco Groth⁴, Steffen Priebe⁵, Johannes Mansfeld^{1,2,6}, Andreas F. Pfeiffer³, Tim J. Schulz³, Reinhard Guthke⁵, Matthias Platzer⁴, Kim Zarse^{1,2}, Michael Ristow^{1,2,3,#}

¹ Dept. of Human Nutrition, Institute of Nutrition, University of Jena, Jena D-07743, Germany

² Energy Metabolism Laboratory, ETH Zürich (Swiss Federal Institute of Technology Zurich), Schwerzenbach/Zürich, CH 8603, Switzerland

³ German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbrücke, Dept. of Clinical Nutrition, Nuthetal D-14558, Germany

⁴ Genome Analysis, Leibniz Institute for Age Research, Fritz-Lipmann-Institute, Jena D-07745, Germany

⁵ Systems Biology and Bioinformatics Group, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Hans-Knöll-Institute, Jena D-07745, Germany

⁶ DFG Graduate School of Adaptive Stress Response #1715, Jena D-07745, Germany

* These authors contributed equally to the data presented.

Corresponding author: michael-ristow@ethz.ch

- Wissenschaftlicher Vortrag beim DGE-Kongress, 14.-16.03.2012 in Weihenstephan:

„Ein nutritiver Aminosäure steigert die Lebenserwartung mittels Induktion von mitochondrialer Aktivität und gesteigerter Bildung reaktiver Sauerstoffspezies“

Josephine Priebs, Michael Ristow

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Mechanismen der Lebensverlängerung durch D-Glucosamin und Ritalin“ selbstständig angefertigt habe.

Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität ist mir inhaltlich bekannt. Es wurden keine Textabschnitte eines Dritten oder eigener Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen. Alle verwendeten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen habe ich als solche gekennzeichnet. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen. Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die vorliegende Dissertation wurde nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Es wurde keine weitere Abhandlung an anderen Hochschulen als Dissertation eingereicht.

Jena, 25. März 2013

.....

Josephine Priebis

Danksagung

Ein großes Dankeschön gilt denjenigen Menschen, die mir bei der Verwirklichung dieser Arbeit behilflich waren.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Michael Ristow für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas und die Möglichkeit die Doktorarbeit am Lehrstuhl für Humanernährung der Friedrich-Schiller-Universität Jena anzufertigen. Die stets kompetente und direkte Betreuung machte ein effizientes Bearbeiten der Projekte möglich.

Weiterhin bedanke ich mich bei all meinen Kollegen und Mitstreitern für die fachlichen Diskussionen und das angenehme Arbeitsklima. Besonders Sebastian Schmeisser danke ich für seine fachliche Hilfe bei der experimentellen Einarbeitung in das Modellsystem *C. elegans*. Zudem war mir Christina Werner eine hilfsbereite Ansprechpartnerin bei Fragen zur Analyse der Nahrungsaufnahme in den Nematoden.

Herzlicher Dank gilt auch Annett Müller, Beate Laube und Waltraud Scheiding für ihre technische Unterstützung, nützlichen Ratschläge und ihre stete Hilfsbereitschaft.

Ebenso danke ich Frau Dr. Shamci Monajembashi vom Leibniz-Institut für Altersforschung/ Fritz-Lipmann-Institut in Jena für ihre engagierte Art bei der Laserablation der ASI-Neuronen.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an meine lieben Eltern und meine Familie, die mich fortwährend unterstützten, wo sie nur konnten.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Ehemann Axel danken, der mir während der gesamten Zeit seelisch und moralisch zur Seite stand und mich immer wieder aufgebaut hat. Er hielt mir den Rücken frei, sodass ich mich ganz auf diese Arbeit konzentrieren konnte.
